

Tóth Eszter

Doktori értekezés

Budapest 2014

A Shadoo fehérje sejtszintű lokalizációja és *traffic*-je

PhD értekezés

Tóth Eszter

ELTE Biológia Doktori Iskola, vezető: Prof. Dr. ERDEI ANNA, D.Sc. egyetemi tanár, a
Magyar Tudományos Akadémia rendes tagja

Molekuláris Sejt- és Neurobiológia alprogram, vezető: Prof. Dr. SASS MIKLÓS, D.Sc.
Habil. egyetemi tanár

Témavezetők

Dr. WELKER ERVIN, D.Sc. tudományos tanácsadó

Dr. LÁSZLÓ LAJOS, C.Sc. egyetemi docens

Kutatóhely

Magyar Tudományos Akadémia, Természettudományi Kutatóközpont, Enzimológiai Intézet

Eötvös Loránd Tudományegyetem, Természettudományi Kar, Anatómiai, Sejt- és
Fejlődésbiológiai Tanszék



Budapest, 2014

TARTALOMJEGYZÉK

RÖVIDÍTÉSJEGYZÉK	6
I. IRODALMI BEVEZETÉS.....	8
1. Bevezetés	8
2. A szivacsos agysorvadásos betegségek – történeti áttekintés	9
3. A celluláris prion fehérje szerkezete, lokalizációja és formái	10
3.1 A PRNP gén/locus jellemzése és a prion fehérje sejt- és szöveti szintű expressziója.	10
3.2 A prion fehérje szintézise, poszttranszlációs módosításai, doménjei és különböző formái	11
3.3 A celluláris prion fehérje funkciója	14
3.4 A prion fehérje sejtszintű lokalizációja	14
4. A prion fehérjecsalád további ismert tagjainak bemutatása	15
4.1 A Doppel fehérje szerkezete, lokalizációja és funkciója.....	15
4.2 A Shadoo fehérje szerkezete, lehetséges lokalizációja és funkciója	16
5. A szekréciós útvonal állomásai.....	18
5.1 Az endoplazmatikus retikulum	19
5.2 Az endoplazmatikus retikulum asszociált degradáció (ERAD)	20
5.3 A Golgi ciszternák	21
5.4 Plazmamembrán és internalizáció	21
6. A sejtmagi transzport.....	22
6.1 A sejtmagi kompartment és a nukleáris pórus komplexek jellemzése	22
6.2 Nukleáris lokalizációs szignálok jellemzése	23
6.3 A sejtmagi transzport jellemzése.....	24
II. CÉLKITŰZÉSEK	25
III. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	26
1. Plazmid konstrukciók és klónozási technikák	26
2. Online dublór enzim-kereső és primer tervező program	27
3. Sejtkultúrák	28
4. Transzfekció.....	29
5. Immuncitokémia.....	29
6. Kezelések	30
7. Konfokális mikroszkópia	30

8. Western blot.....	31
9. Fehérje expresszió és tisztítás.....	32
10. Agaróz gélshift.....	32
11. Bioinformatika.....	33
12. Statisztika.....	33
IV. EREDMÉNYEK.....	35
1. Prokarióta és eukarióta expressziós DNS konstrukciók készítése.....	35
1.1 Az alkalmazott klónozási stratégiák ismertetése egy-egy példa klónozáson.....	35
1.1.1 Különböző inszert klónozási stratégiák.....	35
1.1.1.1 A YFP-Sho konstrukció készítése PCR inszerttel.....	35
1.1.1.2 A GFP-sNLS konstrukció készítése linker inszerttel.....	36
1.1.1.3 A GFP-(Cherry) ₄ -(RXXX) ₈ konstrukció készítése.....	36
1.1.1.4 Irányított mutagenézis bemutatása a YFP-Sho konstrukción.....	37
1.1.2 Dublőr enzimek használata.....	37
1.1.3.1 A Sho-NLS-YFP konstrukció készítése dublőr enzimekkel.....	38
2. Kettős sejtszintű lokalizáció a prion fehérjecsaládban.....	41
2.1 A Shadoo fehérje kettős sejtszintű lokalizációja.....	41
2.2 A prion fehérjecsalád kettős sejtszintű lokalizációja.....	44
3. A Shadoo fehérje funkcionális nukleáris lokalizációs szignálja.....	44
3.1 <i>In silico</i> nukleáris lokalizációs szignál predikciók a Shadoo fehérje esetében.....	45
3.2 A Shadoo fehérje prediktált RGG-box motívuma.....	46
3.3 A Shadoo fehérje (RXXX) ₈ motívuma és bioinformatikai analízise.....	46
3.4 A funkcionális nukleáris lokalizációs szignál meghatározása.....	48
3.4.1 A Shadoo fehérje funkcionális NLS-ének azonosítása deléciós mutánsokkal.....	49
3.4.2 A Shadoo fehérje funkcionális NLS-ének azonosítása fúziós fehérjékkel.....	53
3.5 Az (RXXX) ₈ motívum funkcionális jellemzése.....	53
3.5.1 Az (RXXX) ₈ motívum által közvetített magtranszport jellemzése.....	55
3.5.1.1 A sejtmag pórus komplexen történő átjutás jellemzése.....	56
3.5.1.2 Nukleáris retenciós szignál felderítése a Shadoo és prion fehérjéknél.....	60
4. A Shadoo fehérje endoproteolízise.....	64
5. A Shadoo fehérje útvonala a sejtben.....	65
5.1 A Shadoo fehérje szekréciós szignál szekvenciájának hatékonysága.....	66
5.2 Az endoplazmatikus retikulum, mint a nem konvencionális szekréciós útvonalak lehetséges kilépési pontja.....	67
6. A Shadoo fehérje nukleinsav kötése.....	69

6.1	A fehérje – nukleinsav kötés egyszerű vizsgálatához használt agaróz gélshift módszer bemutatása	69
6.2	A Shadoo fehérje nukleinsav kötésének jellemzése	70
6.3	Az sNLS, RGG, és (RXXX) ₈ motívumok nukleinsav kötésének vizsgálata deléciós és fúziós konstrukciókkal	73
6.3.1	<i>Deléciós fehérjék kettős szálú DNS oligonukleotid kötése</i>	73
6.3.2	<i>Fúziós fehérjék kettős szálú DNS oligonukleotid kötése</i>	74
7.	Az endogén Shadoo fehérje sejtszintű lokalizációja – anti-Shadoo antitestek	75
V.	EREDMÉNYEK ÉRTÉKELÉSE / DISZKUSSZIÓ	78
VI.	ÖSSZEFOGLALÁS	83
VII.	SUMMARY	85
VIII.	KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	86
IX.	IRODALOMJEGYZÉK	88
X.	FÜGGELÉK	94
	SAJÁT KÖZLEMÉNYEK LISTÁJA	99

RÖVIDÍTÉSJEGYZÉK

β-gal – β-galaktozidáz

BiP – *Binding immunoglobulin Protein*

BFA – Brefeldin A

BSA – *bovine serum albumine*

CJD – *Creutzfeldt-Jakob disease* = Creutzfeldt-Jakob betegség

CHO – cukor oldallánc

D/R – DNáz (**D**) és RNáz (**R**) mix

DEG – 2-dezoxi-D-glukóz, dezoxy-glükóz

DMEM – *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

DMSO – dimetil-szulfoxid

Dpl – doppel fehérje

EeyI – Eeyarestatin I

ER – endoplazmatikus retikulum

ERAD – endoplazmatikus retikulum asszociált degradációs útvonal

EYFP/EGFP – *enhanced yellow/green fluorescent protein*

FBS – *fetal bovine serum*

FGF-2 – *large fibroblast growth factor-2*

GPI-horgony – glikofoszfatidil-inozitol horgony

HD – hidrofób domén

hnRNP – *heterogenous nuclear ribonucleoprotein*

IF oldat – immunfluoreszcens oldat

LB – Luria Bertrani médium

MEM – *Minimum Essential Medium*

NLS – nukleáris lokalizációs szignál

NPC – *nuclear pore complex* = nukleáris pórus komplex

ORF – *open reading frame* = leolvasási keret

PBS – *phosphate buffered saline*

PDI – *protein disulfid isomerase*

POM – *nuclear envelope pore membrane protein*

PrP – prion fehérje (**PrP^c**: celluláris prion fehérje, **PrP^{sc}**: *scrapie* forma, **PrP^{sec}**: szekréciós prion fehérje)

qki5 – quaking I-5 fehérje

REP – IIP típusú restrikciós endonukleáz

RES – IIS típusú restrikciós endonukleáz

RPMI – *Roswell Park Memorial Institute Medium*

RUSH – *retention using selective hooks* = megakasztás szelektív horogfehérjék segítségével

SBP – *streptavidin binding peptide* = sztreptavidin kötő domén

Sho – Shadoo fehérje

sNLS – short (= rövid) NLS

SRP – *signal recognition particle*

SS – szekréciós szignál szekvencia

SV40 – *Simian Vacuolating Virus 40*

SYVN1 – *synovial apoptosis inhibitor 1* = synoviolin

TSE – *transmissible spongiform encephalopathies* = szivacsos agysorvadásos betegségek

TTF1 – tiroid transzkripció faktor-1

UBC7 – *ubiquitin conjugating enzyme 7*

YFP/GFP – *yellow/green fluorescent protein*

I. IRODALMI BEVEZETÉS

1. Bevezetés

A fehérje konformációs betegségek közül - orvos-biológiai és társadalmi szempontból is – talán a legjelentősebbek és egyúttal a legnagyobb problémát jelentik a neurodegeneratív kórképek. A legismertebb és leggyakoribb formái az Alzheimer és a Parkinson kór, de ide sorolhatók a szivacsos agysorvadásos betegségek (*transmissible spongiform encephalopathies*, TSE) és a Huntington kór is. Előfordulási arányuk a fejlett országok öregedő népességében az átlagéletkor kitolódásával fokozatosan növekszik. Terápiájuk - az időleges tüneti kezelésen túlmenően – a mai napig nem megoldott, ezek egyelőre gyógyíthatatlan fatális kimenetelű betegségek. Közös jellemzőjük, hogy a központi idegrendszer egyes sejtjeiben, vagy sejtcsoportjaiban egy, esetleg több fehérje fiziológias térszerkezete – többnyire máig ismeretlen okok miatt – megváltozik, s ezáltal az adott fehérje aggregációra hajlamossá válik.

A TSE betegségek közé olyan átvihető, neurodegeneratív betegségek tartoznak, mint a Creutzfeldt-Jakob betegség (CJD) (humán), a Gerstmann-Straussler-Scheinker szindróma (humán), a kuru (humán), a kergemarhakór (szarvasmarha), a súrlókór (birka, kecske) és a krónikus sorvasztó kór (szarvas) [1,2]. A TSE betegségek nagy részénél a kiváltó ok nem ismert (sporadikus, ~80%), viszont esetenként a kialakulás visszavezethető különböző genetikai tényezőkre (~19%), illetve fertőzésre (~1%) [3]. A szivacsos agysorvadásos betegségek során a normális, celluláris prion fehérje (PrP^c) átalakul egy kóros konformációjú, úgy nevezett *scrapie* formává (PrP^{sc}). Mind a mai napig nem tisztázott, hogy ez a megváltozott konformációjú forma hogyan okozza az idegsejtek pusztulását és a betegséget. A celluláris prion fehérje meglete elengedhetetlen a betegség kialakulásához, mivel a PrP^c *knock out* állatok nem fertőzhetők [4].

2. A szivacsos agysorvadásos betegségek – történeti áttekintés

A TSE betegségek kialakulására vonatkozó egyik első elmélet 1954-ből Björn Sigurdssontól származik. A tünetek és a betegség lefolyása alapján úgy gondolta, hogy a betegséget egy „lassú vírus” okozza [5]. William Hadlow volt az első kutató, aki felismerte a hasonlóságot a kuru és a sűrűlőkór között. A sűrűlőkór a juhok és kecskék szivacsos agysorvadás, előfordulásáról már az 1700-as évek óta vannak adatok. Kuruban elhunyt emberek agyát elemezve megfigyelte a sűrűlőkór esetében már ismert léziókat és a kiterjedt neurodegenerációt [6]. William Hadlow a sűrűlőkórral végzett fertőzési kísérletek analógiájára javasolta, hogy a kurut próbálják meg átvinni főemlősökre. Daniel C. Gajdusek és munkatársai sikeresen fertőztek csimpánzokat kuruban meghalt emberek agyhomogenátumával. A „*kuru-like*” szindróma 19-21 hónappal a fertőzést követően alakult ki az állatokban. Ezekkel a kísérletekkel igazolták, hogy egy neurodegeneratív, idegsejteket érintő betegség is lehet fertőző [7]. Daniel C. Gajdusek 1976-ban munkájáért orvosi Nobel-díjat kapott.

A fajon belüli és a fajok közötti átvihetőség felfedezése a szivacsos agysorvadásos betegségeket intenzív orvosi kutatások középpontjába állította. A sűrűlőkór és a kuru közötti hasonlóság felismerését a kuru és a CJD közötti hasonlóság felismerése követte. CJD-ben elhunyt betegek agyából származó kivonattal is sikeresen fertőztek csimpánzokat és kecskéket is, az állatok 1-4 év elteltével mutatták a betegség tüneteit [8,9].

1982-ben Stanley B. Prusiner arra a következtetésre jutott, hogy a fertőző ágens vagy fehérje, vagy egy kisméretű nukleinsav fehérje burokból. Az ágens fertőzőképességét csökkenteni lehetett fehérjéket károsító eljárásokkal, ezzel szemben a nukleinsavakat károsító UV és ionizáló sugárzás a fertőzőképességet nem befolyásolta. Ezekből az eredményekből arra következtetett, hogy a fertőzőképességhez egy fehérje jelenléte mindenképpen szükséges. A fertőző ágens *PRION*-nak nevezte el (*proteinaceous infectious particle*) és definíciója szerint a prion egy kis méretű, fehérje természetű fertőző ágens, amely rezisztens a legtöbb nukleinsav inaktivációs kezelésre [9].

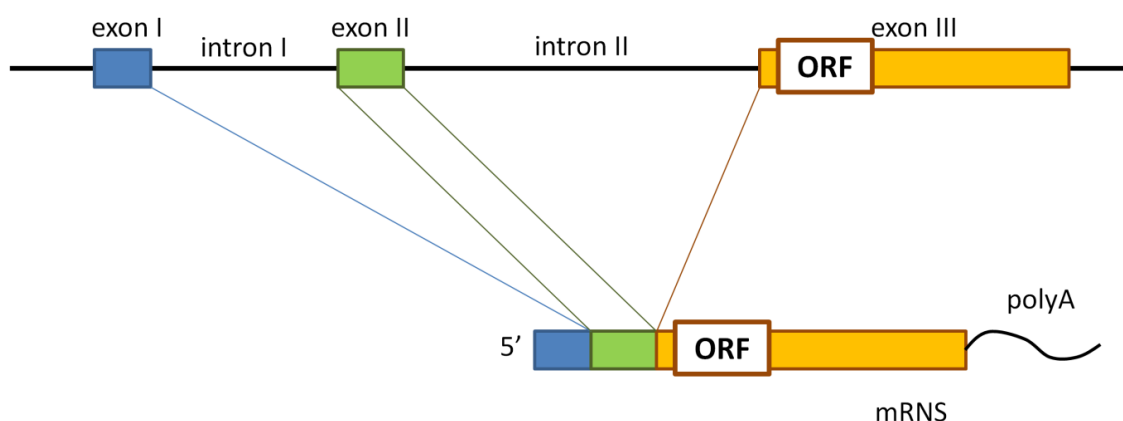
1998-ban sikerült előállítani tisztított fertőző anyagot, amelyből egy peptid fragmens alapján meghatározták, hogy tartalmazza a sejtekben normálisan is előforduló prion fehérjét [10]. A fertőző anyagban található prion fehérjét elnevezték PrP^{sc}-nek, az sc-vel utalva a *scrapie*-re, mely a sűrűlőkór angol megfelelője. A sejtekben előforduló celluláris PrP (PrP^c) proteináz K emésztéssel megkülönböztethető a PrP^{sc} formától. Míg a PrP^c proteáz

szenzitívnek mutatkozott, addig a PrP^{sc} limitált proteolízisen ment csak keresztül [11]. Számos további kísérlettel igazolták Stanley B. Prusiner 1982-es elméletét, miszerint a fertőző anyag templátként szolgál önmaga képződéséhez [9]. Stanley B. Prusiner-t munkájáért 1997-ben orvosi Nobel-díjjal jutalmazták.

3. A celluláris prion fehérje szerkezete, lokalizációja és formái

3.1 A PRNP gén/locus jellemzése és a prion fehérje sejt- és szöveti szintű expressziója

A PRNP gén az egér 2. kromoszómáján, embernél a 20. kromoszómán található. Három exonból áll, a teljes *open reading frame* (leolvasási keret, ORF) a hármask exonban található (1. ábra) [12]. A 2,1-2,5 kb-os mRNS megközelítőleg 85%-át a hármask exon teszi ki. Az mRNS szintjét fejlődő embriókban a *nerve growth factor* szabályozza [13].



1. ábra A PRNP gén és a prion fehérje mRNS-ének szerkezete

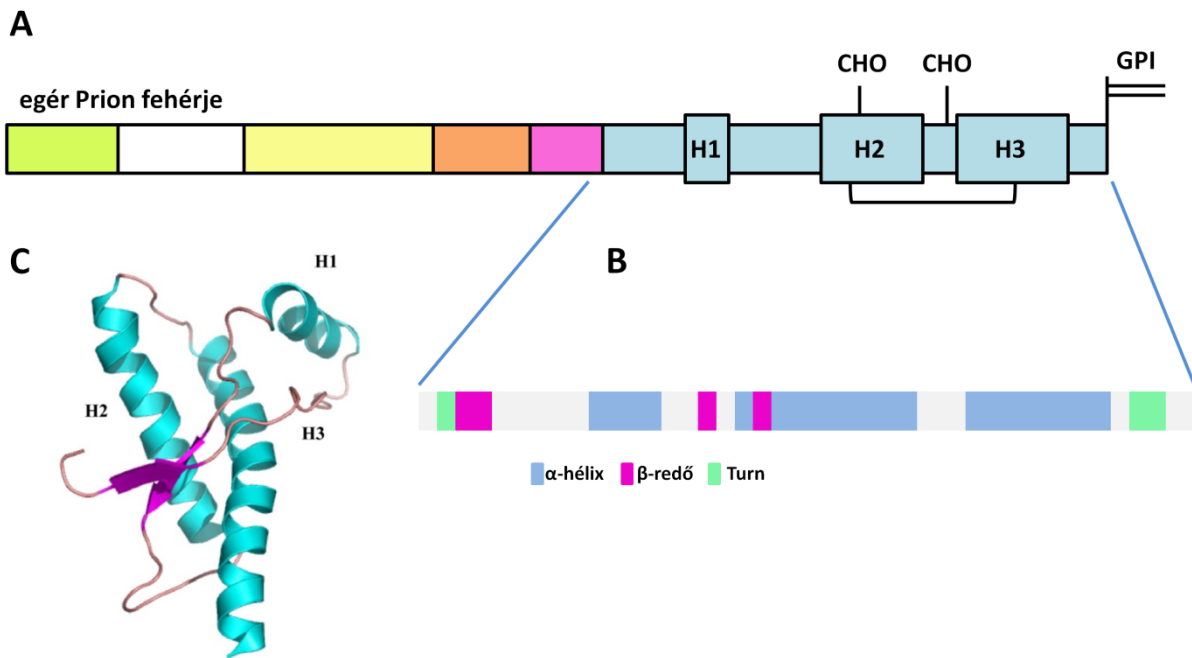
A prion fehérje génje (PRNP) a 2. (egér), illetve 20. (humán) kromoszómán található. Három exonból (exon I, II, III) és két intronból (intron I, II) áll. Az *open reading frame* (ORF) teljes egészében a hármask exonban található meg. Az ábrát a [13] cikk 1-es ábrája alapján készítettem.

A prion fehérje mRNS-e az embriogenezis korai fázisában már kimutatható a fejlődő embrió agyából, és expressziós szintje a fejlődés során fokozatosan emelkedik. A kifejlett állatban a központi idegrendszer területén magas szinten expresszálódik, főleg a neocortex és a hippocampus neuronjaiban, a kisagyi Purkinje sejtekben, a gerincvelői motoros

neuronokban és gliasejtekben [13,14]. A prion fehérje az idegrendszer elemein túl még számos más szövetben is expresszálódik, úgy mint a limforetikuláris rendszer elemeiben (például: follikuláris dendritikus sejtek), az emésztőrendszer elemeiben, a bőr, máj és tüdő bizonyos sejtjeiben, illetve a szem, hasnyálmirigy, vese, szív és nyálmirigyek területén. Kimutatható továbbá a hímivarsejtekben, a mononukleáris sejtekben és a makrofágokban is [13].

3.2 A prion fehérje szintézise, poszttranszlációs módosításai, doménjai és különböző formái

A celluláris prion fehérje egy GPI-horgonyos (glikofoszfatidil-inozitol horgony), a sejtek extracelluláris felszínén levő plazmamembrán fehérje, mely az N-terminálisán található szekréciós szignál (2/A ábra, *zölddel jelölt régió*) révén a szekréciós útvonalra kerül. A fehérje a durva felszínű endoplazmatikus retikulum (ER) riboszómáin szintetizálódik és kotranszlációs transzlokációval kerül az ER-be. A kotranszlációs transzlokáció során a szekréciós szignál az ER lumenében levágódik a szintetizálódó polipeptidről [14,15]. Az ER-ben kialakul egy diszulfid híd a 178-as és 213-as ciszteinek között (egér esetében) (2/A ábra, *2-es és 3-as α -hélix közötti összekötő vonal jelzi a diszulfid híd helyét*) [14]. A GPI-horgony szignálról az ER-ben átkerül egy úgynevezett pre-GPI-horgonyra a fehérje [16,17], illetve 180-as és 196-os aszparaginjára magas mannóz tartalmú cukor oldalláncok kerülnek (2/A ábra, *GPI, CHO*) [14,18]. A prion fehérje ezen aszparaginjainak mutációjával a fehérje konformációja megváltozik és a transzport a mediális Golgi ciszterna területén megakad [19]. Az ER-ből a fehérjék vezikulákba csomagolódnak és a Golgi ciszternákba kerülnek. A Golgi ciszternákban a prion fehérje cukor oldalláncai komplex típusú, szíálsav tartalmú cukor oldalláncokká módosulnak, az ER-ben kapott pre-GPI-horgonya pedig további szíálsav molekulákkal egészül ki, majd az érett fehérje vezikulák közvetítésével a sejtmembránba kerül [14,15]. A GPI-horgony a PrP^c-t a plazmamembrán speciális mikrodoménjaihoz, az úgynevezett lipid raftokhoz kapcsolja, ezáltal olyan specifikus kölcsönhatásokat tud létesíteni egyéb membránfehérjékkel, melyek esszenciális szerepet töltenek be fiziológiai funkciói ellátásában [20,21]. A celluláris prion fehérje szintézise nagyjából 30 perc alatt zajlik le, az érett fehérje féléletideje pedig 3-6 óra között változik [13,22,23].



2. ábra A celluláris prion fehérje másodlagos és harmadlagos szerkezete

A.) Az egér PrP^c sematikus struktúrája. Zöld: szekrécións szignál szekvencia, fehér: extrém N-terminális, sárga: octarepeat régió, narancssárga: pozitívan töltött régió, rózsaszín: hidrofób domén, kék: C-terminális rendezett régió, külön jelölve a három hélix (H1, H2, H3), CHO: aszparagin glikozilációs helyek, GPI: glikofoszfatidil-inozitol horgony. A kettes (H2) és hármass (H3) hélixek között kialakuló diszulfid hidat egy összekötő vonal jelöli. Az ábra arányosan mutatja be az egyes régiók méretét. **B.)** Az egér PrP^c C-terminálisának másodlagos szerkezete. A B.) ábrát az alábbi linken található ábra alapján készítettem: <http://www.uniprot.org/uniprot/P04925>. **C.)** A PrP^c rendezett C-terminálisának 3D szerkezete (forrás: [24]).

A celluláris prion fehérje egy rendezetlen N-terminális régióból és egy rendezett, többségében α -héliceket tartalmazó C-terminálisból áll, melynek NMR és röntgen spektroszkópiás szerkezete is ismert (2/B és C ábra). A fehérje extrém N-terminálisán egy rövid, pozitív aminosavakból álló, jellegzetes és konzervált szekvencia található (KKRPK, 23-27-es aminosavak) [25]. A rendezetlen régióban található öt darab 8 aminosavas (PHGGGWGQ, 51-90-es aminosavak) ismétlődő szekvencia (octarepeat régió) (2/A ábra, sárgával jelölt régió), melynek hisztidinjei képesek rézionokat megkötni [26,27]. Az ismétlődések számának növekedésével járó mutációk örökletes szivacsos agysorvadás kialakulásához vezethetnek [28]. Ez után a régió után egy viszonylag sok pozitív töltésű aminosavat tartalmazó szakasz következik (2/A ábra, narancssárgával jelölt régió) [29], majd egy hidrofób palindrom szekvencia (hidrofób domén, HD) (2/A ábra, rózsaszínnel jelölt régió), amely nagyon jellemző a prion fehérjékre. Ebben a doménben található mutációknak, vagy a domént is érintő N-terminális deléciónak szintén neurotoxikus hatása van [30,31]. A

pozitív és hidrofób régiókat együttesen centrális régióknak is nevezik. A C-terminális rendezett régióban három α -hélix, illetve három rövidebb β -redő található (2/B és C ábra).

A celluláris prion fehérje és a *scrapie* forma néhány lényeges dologban különbözik. Egyrészt az átalakulás során a β -redők kiterjedése megnövekszik a C-terminális régióban. Míg a PrP^c körülbelül 40% α -hélixből épül fel és β -lemezt alig tartalmaz (3%), addig a PrP^{sc} legalább 45%-a β -lemez. Másrészt a fehérje aggregációra hajlamossá válik és részlegesen proteáz rezisztens lesz [13,32].

A 208 aminosavas, érett, egér prion fehérje az esetek többségében már nem tartalmazza a szekréciós és GPI-szignál szekvenciákat, harmadlagos szerkezetét egy diszulfidhíd stabilizálja, illetve a C-terminális két aszparaginjára cukoroldallácok kerülhetnek. Változó, hogy az egyes PrP molekulák glikozilálódnak-e, és ha igen, mely helyeken. Eszerint megkülönböztetünk glikozilálatlan, valamint mono- és diglikozilált formákat, amelyek a sejtben egyidejűleg vannak jelen [12]. Annak ellenére, hogy a prion fehérje egy GPI-horgonyos fehérje, egyéb formái is ismertek, amelyek nem GPI-horgonnyal, hanem egy-egy transzmembrán régióval rögzülnek a sejtmembránhoz [33], illetve egy citoplazmatikus formáját is leírták, amely feltehetően a szekréciós szignál második metioninjáról indulva alternatív transzlációs iniciációval keletkezhet [34,35] és bekerülhet a sejtmagba [35]. Ezek mellett a prion fehérje levágódhat a GPI-horgonyról a sejt felszínén (*shedding*), melynek következtében szekréciós prion fehérje keletkezik [36,37,38].

A celluláris prion fehérje több endoproteolitikus fragmentuma is megfigyelhető a sejtekben. Leggyakoribb az úgynevezett C1 fragmentum, amely a HD régió előtti hasítás során keletkezik és nagyjából 17 kDa molekulásúlyú [39,40]. Egészséges sejtekben megfigyelhető egy másik hasítási termék is, az úgynevezett C2 fragmentum, mely méretét tekintve kicsit hosszabb régiót tartalmaz, mint a C1 forma. A C2 fragmentum kialakulásához vezető hasítás az *octarepeat* régió után történik. A C2 forma fertőzött szövetekben sokkal magasabb szinten figyelhető meg [39,40]. A két peptidfragens mellett megfigyelhető egy harmadik hasítás is, amely az érett fehérjét leválasztja a GPI-horgonyáról (*shedding*), így jön létre a szekréciós prion fehérje (PrP^{sec}) [37,41,42].

3.3 A celluláris prion fehérje funkciója

Annak ellenére, hogy több évtizede foglalkoznak már a prion fehérjével, még mindig nem tudjuk a pontos, fiziológias funkcióját. Már bizonyított, hogy a prion fehérje N-terminális, rendezetlen régiójában levő *octarepeat*-ek megkötik a rézionokat [26,27], ami hozzájárulhat a neuronok rézháztartásához [43]. A prion fehérje anti-apoptotikus hatása, overexpresszáltatva menti a sejteket a Bax-indukálta sejthaláltól [44], illetve menti a sejtpusztulástól a Shmerling-mutáns prion fehérjét, vagy Doppel fehérjét ektopikusan expresszáló neuronokat [45,46]. Számos további folyamattal hozták kapcsolatba úgy, mint szignalizáció, emlékezés, sejtproliferáció, differenciáció, az idegsejtek mielin-hüvelyének kialakulása, cirkadián ritmus működése, sejtadhézió létrejötte, szinaptikus aktivitás [1,47,48], ám kérdés, hogy ezen folyamatok közül melyik hozható kapcsolatba fiziológiásan is a prion fehérjével, illetve a szivacsos agysorvadás betegségekkel, továbbá a prion fehérje nagyfokú konzerváltságával. Az a tény, hogy a prion fehérje sokkal magasabb szinten expresszálódik az idegsejtekben, mint minden más sejttypusban [13,49] azt sugallja, hogy különösen fontos szerepe lehet a neuronok esetében.

3.4 A prion fehérje sejtszintű lokalizációja

A celluláris prion fehérje egy sejtfelszíni fehérje, a sejtekben legnagyobb mennyiségben a plazmamembránban figyelhető meg. Szintézise és érése a szekréciós útvonalon történik, így megfigyelhető az ER-ben és a Golgi ciszternák területén is. Az érett fehérje internalizációval bekerül az endoszómális kompartmentbe, innen reciklizálódhat a plazmamembránba, vagy az endoszóma lizoszómákkal történő egyesülését követően degradálódhat [13].

A prion fehérje különböző formáit a sejtmagban is megfigyelték. A PrP^{sc} fertőzött neuroblasztóma sejtvonalban (ScN2a) immuncitokémiai festéssel kimutatták a prion fehérjét a sejtmagból [50,51], illetve a prion fehérje fiziológias körülmények között megfigyelhető volt a Lieberkühn kripták osztódó sejtjeinek magjában [52]. Gu és munkatársai (2003) szerint a prion fehérje N-terminálisán két nukleáris lokalizációs szignál szekvencia (NLS) is található. Mindkét szignál szekvencia lizinben gazdag, az egyik az extrém N-terminális **KKRPPKVG** szekvencia (NLS1), míg a másik az *octarepeat*-ek után következő **KPSKPKTNMKHM** szekvencia (NLS2) [29,53]. További mutáns formáiról szintén leírták a sejtmagi lokalizációt.

A prion fehérje szignálok nélkül a sejtmagban figyelhető meg [54], illetve szekréciós szignáljának második metioninjáról alternatív transzlációs iniciációval szintén a sejtmagban lokalizálódik [34,35].

4. A prion fehérjecsalád további ismert tagjainak bemutatása

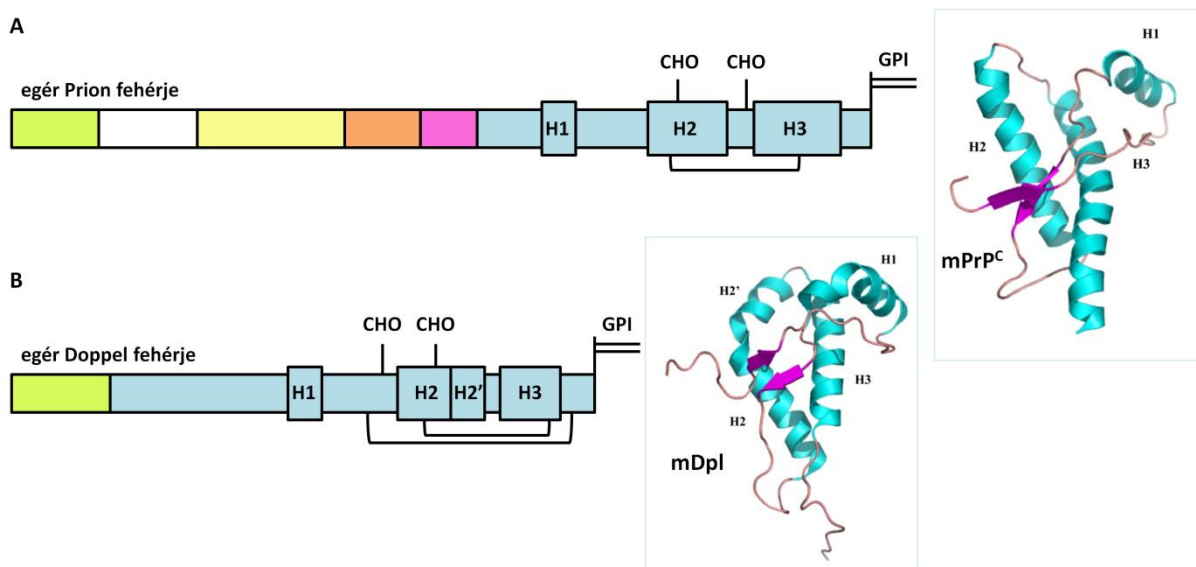
4.1 A Doppel fehérje szerkezete, lokalizációja és funkciója

A doppel fehérjét 1999-ben fedezték fel indirekt módon. Míg bizonyos prion fehérje *knock out* egértörzsek nem mutattak semmilyen fenotípusos abnormalitást, addig az *Ngsk PrnP^{0/0}* és *Rcm0 PrnP^{0/0}* egértörzs esetében a felnőtt állatoknál ataxia és a kisagyi Purkinje sejtek pusztulása volt megfigyelhető [55,56]. Eleinte bizonyítottnak tűnt, hogy a prion fehérje kiütése ataxiához, idegsejtpusztuláshoz, majd az állatok halálához vezet, de pontosabb vizsgálatokkal kiderítették, hogy a kapott fenotípus a doppel fehérje expressziójával van kapcsolatban [56]. A prion fehérje génjének (*PRNP*) kiütésekor a promóter szekvenciát meghagyták, mely így az utána következő régiót, s így a doppel fehérje expresszióját valósította meg. További kísérletekkel igazolták, hogy a doppel fehérje ektópikus expressziója a központi idegrendszerben a szivacsos agysorvadáshoz hasonló tünetekkel és végül az állatok pusztulásával járt. A doppel fehérje normális körülmények között, felnőtt állatokban a szív és a here területén expresszálódik, kiütése a hím egerek sterilitásához vezet [56,57,58,59,60,61].

A doppel fehérje térszerkezete nagyon hasonló a prion fehérje rendezett C-terminálisához, két N-glikozilációs hellyel rendelkezik, szerkezetét két, az ER-ben kialakuló diszulfid-híd stabilizálja (3. ábra). A prion fehérje C-terminális része és a teljes doppel fehérje aminosav szekvenciája nagyjából ~25%-os azonosságot mutat [62,63]. A doppel fehérje is a szekréciós útvonalon szintetizálódik, N-terminálisán szekréciós szignál, C-terminálisán pedig GPI-horgony szignál található (3. ábra) [57,61,64].

A doppel fehérje funkciójának vizsgálatához elkészítették a doppel *knock out Prnd^{neo/neo}* egértörzset. Az állatok megfelelően fejlődtek és növekedtek, ám a hím egerek sterilek voltak. Úgy találták, hogy az állatok heréje szövettanilag megfelelő volt, a spermatogenezis korai fázisa után azonban különböző rendellenességek mutatkoztak. Az érett

hímivarsejtek száma drasztikusan lecsökkent, a hímivarsejtek lassabbak voltak, és az akroszóma sem alakult ki megfelelően. Az érett hímivarsejtek végső soron képesek voltak megtermékenyíteni a petesejtet, de csak a *zona pellucida* eltávolítása után. Mindezek alapján megállapítható, hogy a doppel fehérje feltehetően szükséges az akroszóma kialakításához és a hím gametogenezishez [61]. A prion fehérje overexpressziója nem tudta kivédeni a doppel *knock out* hím egerek steril fenotípusát [61].



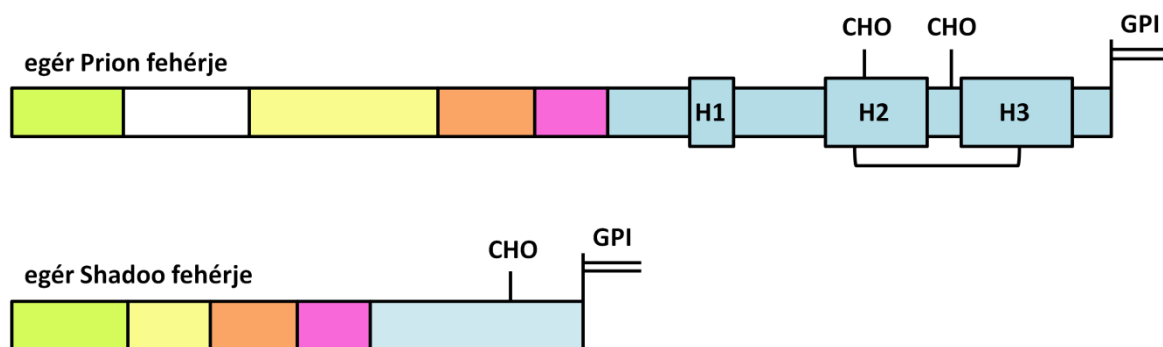
3. ábra A prion és doppel fehérjék szerkezetének összehasonlítása

A.) Az egér prion fehérje sematikus struktúrája és harmadlagos szerkezete (mPrP^C: egér celluláris prion fehérje), **B.)** A doppel fehérje sematikus struktúrája és harmadlagos szerkezete (mDpl: egér doppel fehérje). Zöld: szekréciós szignál szekvencia, fehér: extrém N-terminális, sárga: octarepeat régió, narancssárga: pozitívan töltött régió, rózsaszín: hidrofób domén, kék: C-terminális rendezett régió, külön jelölve a hélixek (H1, H2, H2', H3), CHO: aszparagin glikozilációs helyek, GPI: glikofoszfatidil-inozitol horgony. Az ábra arányosan mutatja be az egyes régiók méretét.

4.2 A Shadoo fehérje szerkezete, lehetséges lokalizációja és funkciója

2003-ban Premzl és munkatársai leírtak egy, a prion fehérje N-terminálisához felépítésében nagyon hasonló fehérjét, a Shadoo-t (*shadow of prion protein*, Sho) [65,66]. Mindkét fehérje tartalmaz egy ismétlődő (*repeat*) régiót (prion fehérje: *octarepeat* régió, 51-90-es aminosavak; Shadoo fehérje: XXRG *tetrarepeat*-ek, 26-48-as aminosavak), illetve mindkét fehérje rendelkezik egy hidrofób doménnel (prion fehérje: 110-130-as aminosavak, Shadoo fehérje: 63-82-es aminosavak). A különböző szignálok alapján a két fehérje lokalizációja feltehetően hasonló. A prion fehérjéhez hasonlóan a Shadoo is rendelkezik szekréciós szignál szekvenciával, GPI-horgony szignállal és N-glikozilációs hellyel, ami a

szekrécións útvonalon történő szintézisre utal. Az érési folyamat során a Shadoo fehérje N-terminális szekrécións szignálja levágódik, GPI-horgony szignálja GPI-horgonyra cserélődik és a 107-es aszparaginjára cukor oldallánc kapcsolódik (4. ábra), így várhatóan a plazmamembránban lokalizálódik. A GPI-horgony és az aszparaginhoz kapcsolt cukor oldallánc meglétét igazolták tag-elt Shadoo fehérjén és az endogén fehérjén egyaránt foszfatidil-inozitol specifikus foszfolipáz-C és PNGase F emésztésekkel. Az érett fehérje horgony és oldalláncok nélkül 9,1 kDa [30,67]. A strukturális hasonlóságok mellett, számos egyéb hasonlóság is van a két fehérje között.



4. ábra A prion és Shadoo fehérjék szerkezetének összehasonlítása

A.) Az egér prion fehérje sematikus struktúrája, **B.)** A Shadoo fehérje sematikus struktúrája. Zöld: szekrécións szignál szekvencia, fehér: extrém N-terminális, sárga: repeat régió, narancssárga: pozitívan töltött régió, rózsaszín: hidrofób domén, kék: C-terminális régió, a prion fehérje esetében külön jelölve a hélixek (H1, H2, H3), CHO: aszparagin glikozilációs helyek, GPI: glikofoszfatidil-inozitol horgony. Az ábra arányosan mutatja be az egyes régiók méretét.

A Shadoo fehérje N-terminálisa sok pozitív töltésű arginint és glicint tartalmaz és erősen konzervált a gerincesek körében. Corley és munkatársai (2008) úgy találták, hogy ez a régió megfeleltethető az RNS-kötő RGG-box motívumnak [68], és ezzel összhangban Lau és munkatársai (2012) közlése alapján pedig a Shadoo - *in vitro* körülmények között - valóban képes nukleinsavakat megkötni a prion fehérjéhez hasonlóan [69].

A Shadoo fehérjét kimutatták egér, patkány, ember [30,65], birka [70], és marha agyból [71], illetve kisebb mennyiségben heréből, nyirokcsomókból, az emésztőtraktus különböző szakaszaiból néhány fajban [70,71]. Fejlődő egér embriókban a 16. napon már kimutatható volt [30]. Az eddig igazolt szöveti lokalizációk közül a Shadoo fehérje messze magasabb szinten expresszálódik a központi idegrendszerben, mint a többi vizsgált szövetben, mind fejlődő embriókban, mind pedig felnőtt állatokban [13,30,65,66]. Továbbá, hasonlóan a

prion fehérjéhez, a teljes hosszúságú, cukor oldallánccal rendelkező érett Shadoo fehérje is megfigyelhető a Shadoo-t expresszáló sejtek médiumában [72].

Régóta keresik azt a hipotetikus π fehérjét, mely a prion fehérje *knock out* állatokban átveheti a prion fehérje N-terminálisának feltételezett kritikus funkcióját. A kezdeti eredmények alapján a Shadoo fehérje megfelelő jelölt lehet, hiszen felépítését tekintve pont a prion fehérje antiapoptotikus és citoprotektív hatást közvetítő N-terminálisához hasonlít. Továbbá a prion fehérje fiziológias funkciójának megértését segítheti, ha a fehérjecsalád analóg tagjának funkcióját vizsgáljuk, és ezáltal próbálunk következtetni a prion fehérje rengeteg azonosított funkciójára közül azokra az átfedőkre, melyek a fiziológias működés és a betegség szempontjából relevánsak.

A Shadoo funkciójáról egyelőre keveset tudunk. Hasonló citoprotektív hatást mutattak ki a Shadoo esetében a doppel overexpresszáló idegsejtenyészeten, mint a prion fehérjénél [30]. További érdekesség, hogy a prion fehérje *knock out* egerekben a Shadoo fehérje csendesítése az embriók pusztulását okozza a fejlődés korai szakaszában, hangsúlyozva ezzel a két fehérje feltehetően fontos szerepét az embriogenezisben. A csendesítés során az embriók velőcső fejlődésében tapasztaltak zavart [73]. Egy későbbi kísérletsorozattal igazolták, hogy már a specifikusan a *trophoblast* sejtekben történő csendesítés is embrió letalitáshoz vezet [74]. Ezzel szemben a prion és Shadoo fehérje dupla *knock out* egerek embrionális fejlődése normálisnak bizonyult [75,76].

5. A szekréciós útvonal állomásai

A fehérjék sejten belüli útját és lokalizációját különféle szignálok irányítják. Ez az úgynevezett szignál hipotézis, amelyet Günter Blobel molekuláris biológus javasolt az 1970-es években. A hipotézis szerint a szekrécióra szánt fehérjék útját egy, az érett fehérjén sok esetben már nem megtalálható szekvencia irányítja. Ezt a hipotézist Blobel és más csoportok nagyjából 20 év alatt sikeresen igazolták. Günter Blobel munkájáért 1999-ben Nobel díjat kapott [77,78].

A prion fehérjecsalád minden tagja rendelkezik szekréciós szekréciós szignállal és GPI-horgony szignállal, szintézisük tehát várhatóan a durva felszínű ER-ben kotranszlációs transzlokációval zajlik. Ezek a fehérjék a továbbiakban megjárják a szekréciós útvonal állomásait, úgymint az ER-t, a Golgi ciszternákat és végül a plazmamembránba kerülnek. A plazmamembránból internalizálódhatnak és reciklizálódhatnak vagy lebomolhatnak, illetve különböző metalloproteázokkal a sejtfelszínről lehasítódhatnak és a sejtközi térbe kerülhetnek [12].

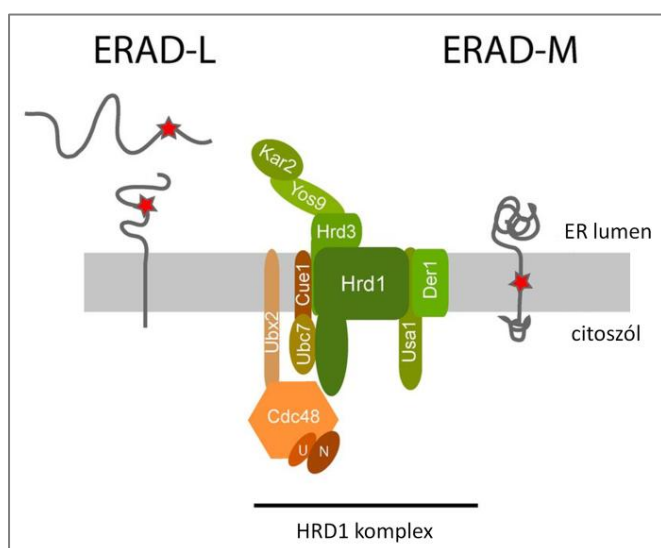
5.1 Az endoplazmatikus retikulum

Az ER-be irányító szignálok rövid, 15-30 aminosavas, többnyire hidrofób szekvenciák, melyek általában a fehérjék N-terminálisán, illetve transzmembrán fehérjék esetében az első transzmembrán doménben találhatóak. A szekréciós szignál szekvenciák hidrofób régióját megelőzheti egy pozitív aminosavakat tartalmazó rövid szekvencia, mely az ER lumenébe történő transzlokációt segíti elő [79,80,81]. A fehérjék szintézise szabad riboszómákon kezdődik meg, és az N-terminális nagyjából 70 aminosavas polipeptid lánc elkészültekor a szekréciós szignál elérhetővé válik a szignál felismerő ribonukleoprotein komplex számára (SRP – *signal recognition particle*). A szintézis egy időre megáll, a riboszóma az ER membránjához toborzódik, majd a szignál szekvenciához kötött SRP az ER membránjában rezidens receptorához kapcsolódik. Az SRP receptor egy GTP kötő fehérje, mely SR- α és SR- β alegységekből áll. Az α alegység kapcsolódik az SRP-riboszóma-szintetizálódó polipeptid komplexhez, míg a β alegység az ER membránjához rögzíti a fehérjét. A receptor és ligandja két GTP-t köt meg, melyek a dokkolást követően hidrolizálnak, így a receptor és az SRP közötti kapcsolat megszűnik, az SRP reciklizál a citoszolba, a transzláció pedig folytatódik [81,82,83]. A transzlokáció a Sec61 transzlokonon keresztül történik. Az N-terminális szignál szekvenciákat a transzlokációt követően a szignál peptidáz komplex lehasítja a fehérjéről [81,83,84]. A transzláció megakasztásával, majd újraindításával zajló transzlokációt kotranszlációs transzlokációnak is nevezzük. Az ER lumenében a naszcens fehérjét különböző chaperonok veszik körül (BiP, *Binding immunoglobulin Protein*), melyek védik az aggregációtól és segítik a megfelelő szerkezet kialakulását [80,81,83,84]. Az ER-ben ezután a fehérjék különböző érési folyamatokon mennek keresztül. A prion fehérjecsalád tagjai és sok más fehérje rendelkezik GPI-horgony szignál szekvenciával, amellyel az ER membránjába ágyazódnak. A GPI-horgony szignál a

fehérjék C-terminálisán található, három régióra osztható szekvencia. A többnyire kis aminosavakból álló ω -site jelöli ki a hasítás és a horgonyhoz történő kapcsolódás helyét, ezt követi egy 6-12 aminosav hosszúságú, enyhén poláros régió, majd egy 10-20 aminosavas hidrofób szegmens. A szignál az ER membránjában lehasad és a fehérjék egy pre-GPI-horgonyra kerülnek [16,81,84]. A prion fehérjecsalád tagjai mind rendelkeznek egy vagy több N-glikozilációs hellyel. Ezen helyek felismerése és a cukor oldalláncok kapcsolása szintén az ER lumenében történik. Bizonyos fehérjék harmadlagos szerkezetét diszulfid hidak stabilizálják. Ezek az ER-ben már kialakulnak, kialakulásukat és átrendeződésüket a PDI (*protein disulfid isomerase*) fehérjék segítik [80,81,83,84].

5.2 Az endoplazmatikus retikulum asszociált degradáció (ERAD)

Az ER-ben található hibás konformációjú fehérjék az úgynevezett ER asszociált degradációs útvonalon poliubiquitinálódnak, majd a proteaszómák révén eliminálódnak. Az ER-ben található hibás konformációjú, nem megfelelően glikozilált és/vagy szabad ciszteinnel rendelkező fehérjék felismerést követően ubiquitinálódnak. Az ubiquitinálást olyan fehérjék katalizálják, mint az ER asszociált UBC7 (*ubiquitin conjugating enzyme*) E2 ubiquitin ligáz és a SYVN1 (*synoviolin* = *synovial apoptosis inhibitor 1*) E3 ubiquitin ligáz (5. ábra). A citoszolba történő transzlokáció egy mindmáig azonosítatlan transzlokátoron keresztül történik. A citoszolban a poliubiquitinált fehérjéket a VCP/p97 komplex ismeri fel és irányítja a proteaszómákhoz [80,81,85].



5. ábra Az ERAD komponensei élesztőben

Az ábrán láthatóak az ER lumenében (ERAD-L), illetve a membránban (ERAD-M) található hibás konformációjú fehérjék felismeréséért és ubiquitinálásáért felelős HRD1 komplex elemei élesztőben. A hibás konformációt egy piros csillag jelöli a fehérjéken. A HRD1 fehérje humán megfelelője a SYVN1, a Cdc48 komplex pedig emlősekben p97 komplex néven ismert. Az ábrát a [85] cikk 1-es ábrája alapján készítettem.

5.3 A Golgi ciszternák

Az ER-be jutott fehérjék egy része vezikulákba csomagolódik és a Golgi ciszternákba kerül. A vezikulák kialakulását a Sar1 által mediált membrán deformáció és a további COPII komplex elemek (Sec23, Sec24, Sec13, Sec31) toborzása inicializálja [80,81,83,86,87]. A Golgi ciszternák esetében megkülönböztetünk cisz, mediális és transz ciszternákat. Ezek közül az ER-ből származó vezikulák a cisz-Golgi hálózat területén dokkolnak. A Golgi ciszternákban számos további poszttranszlációs módosítás történik, például az ER-ben kapott cukor oldalláncok és a GPI-horgony a Golgi ciszternákban tovább módosulnak, itt alakul ki a lizoszómális fehérjéken a mannóz-6-foszfát szignál [81,83]. Bizonyos fehérjék a Golgi ciszternák területén különböző membrán mikrodoménekbe (például lipid raftokba) rendeződnek. A transz-Golgi ciszterna után egy hálózatos struktúra látható hasonlóan a cisz-Golgi hálózathoz, ez a transz-Golgi hálózat. A transz-Golgi hálózatban történik meg az érett fehérjék szétválogatása és a vezikulák lefűződése [81,83,87]. Három különböző vezikula típust különítünk el: i.) lizoszómális vezikulák, ii.) exocitotikus vezikulák és iii.) a szabályozottan ürülő szekréciós vezikulák [88,89]. Ez utóbbi két típus célállomása a plazmamembrán. A vezikulák a plazmamembránnal fúzionálva tartalmukat az extracelluláris térbe ürítik, membránjukban található fehérjék pedig a plazmamembránba kerülnek [81,87,89].

5.4 Plazmamembrán és internalizáció

A szekréciós útvonalon szintetizálódó és transzmembrán régióval vagy GPI-horgonnyal rendelkező fehérjék célállomása a sejteket határoló plazmamembrán. A plazmamembrán fehérjei között megkülönböztetünk integráns membránfehérjéket, illetve perifériás membránfehérjéket, amelyek a plazmamembrán extracelluláris vagy intracelluláris oldalán találhatóak. A fehérjék egy része speciális lipid horgonyokkal kapcsolódik a plazmamembránhoz [81]. A plazmamembrán területén az egyes fehérjék különféle mikrodoménekben lokalizálódnak, illetve számos módosításon mehetnek keresztül [81,83]. Például a GPI-horgonyos fehérjék különböző mátrix metalloproteázokkal lehasíthatnak a horgonyról és a sejtek közötti térbe kerülhetnek (*shedding*) [81]. A plazmamembránból a fehérjék meghatározott területeken internalizálódhatnak és így bekerülnek a korai endoszómális kompartmentbe. Innen exocitózissal ismét kikerülhetnek a plazmamembránba, vagy a késői endoszómák lizoszómákkal történő egyesülésével degradálódhatnak. A késői

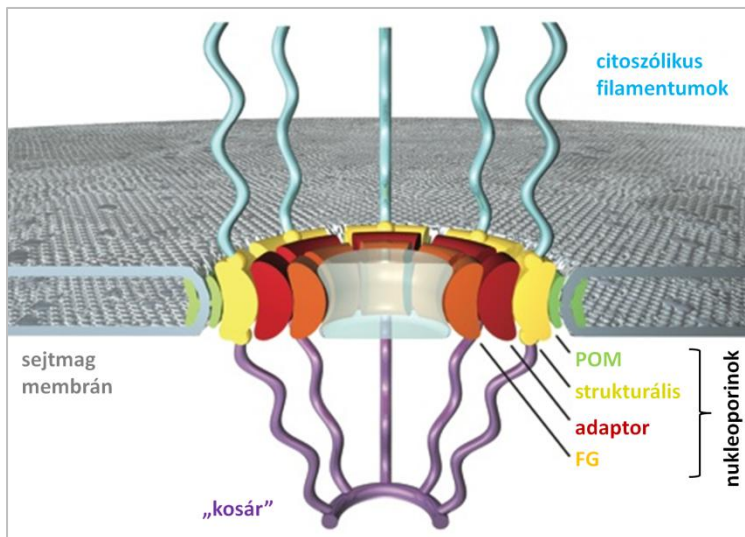
endoszómákból kialakulhatnak az úgynevezett multivezikuláris testek, amelyek kis vezikulákat tartalmazó membránnal határolt terek [81,83]. A multivezikuláris test plazmamembránnal történő fúziója a kis vezikulák, más néven exoszómák sejtközi térbe történő ürítésével jár. A kóros konformációjú prion fehérje sejtről sejtre történő terjedésének egyik módja lehet az exoszómákkal történő terjedés [90].

6. A sejtmagi transzport

Az eukarióta sejtek kompartmentalizáltak, a sejt bizonyos terei membránnal határoltak és ezáltal elkülönülnek egymástól. A kompartmentalizáció eredménye, hogy egy sejten belül egyidejűleg számos eltérő, különböző környezetet igénylő metabolikus folyamat tud működni.

6.1 A sejtmagi kompartment és a nukleáris pórus komplexek jellemzése

Az eukarióta sejtek egyik jellegzetes membránnal határolt tere a sejtmag, mely kapcsolatban áll a citoszollal, és minden osztódást követően újraszerveződik. A citoszol és a sejtmag közötti kapcsolatot az úgynevezett nukleáris pórus komplexek biztosítják, melyek speciális fehérjekomplexekből állnak. A nukleáris pórus komplexeken (NPC = *nuclear pore complex*) a kisméretű (<60 kDa) fehérjék szabadon, diffúzióval átjuthatnak, míg a nagyobb méretű fehérjék importját és exportját különböző karrier fehérjék végzik (a β -karioferin család importinjai, karrierjei és exportinjai) [81,91,92]. A nukleáris pórus komplexek oktagonális szimmetriájú fehérje komplexek, melyeket úgynevezett nukleoporinok építenek fel. A nukleoporinok között megkülönböztetünk strukturális, adaptor és FG (fenilalanin és glicin gazdag) nukleoporinokat, továbbá a citoszolikus filamentumokat és a sejtmagi oldalon megfigyelhető „kosár” struktúrát alkotó nukleoporinokat (6. ábra). A pórus komplexet különböző integráns nukleoporinok (például: POM121, gp210) rögzítik a sejtmag membránhoz. A pórus komplex vázát a strukturális és adaptor nukleoporinok alkotják, míg a pórus szelektivitásáért és specificitásáért az FG nukleoporinok a felelősek [81,93,94].



6. ábra A nukleáris pórus komplex sematikus felépítése

A sugaras szimmetriájú nukleáris pórus komplexet az integráns POM (nuclear envelope pore membrane protein) fehérjék rögzítik a sejtmag membránhoz. Ezek közvetlenül a strukturális nukleoporinokkal vannak kapcsolatban, melyek az adaptor nukleoporinokon keresztül az FG nukleoporinok vázaként funkcionálnak. A nukleáris pórus komplex citoszolikus és sejtmagi

oldala eltér, a citoszol felé filamentumokat, míg a sejtmag felé az úgynevezett „kosár” struktúrát találjuk. Az ábrát a [93] cikk 3-as ábrájának lefordításával készítettem.

6.2 Nukleáris lokalizációs szignálok jellemzése

A sejtmagi lokalizációért felelős szignálokat együttesen nukleáris lokalizációs szignáloknak (NLS) nevezzük. Ezen fehérjeszekvenciák feladata a sejtmagi transzport mediálása és/vagy a specifikus nukleáris retenció kialakítása [81]. Megkülönböztetünk klasszikus és nem klasszikus nukleáris lokalizációs szignálokat. A klasszikus szignálok egy vagy két, pozitív aminosavakból (leggyakrabban lizinből) felépülő egységekből állnak. Az egy egységből felépülőket (K/R_{4-6}) *monopartite*, míg a két egységből felépülőket ($K/R_2 \times_{10-12} K/R_3$) *bipartite* NLS-eknek hívjuk. A *monopartite* NLS-eket az arginin, lizin és prolin aminosavak elrendeződése alapján további két típusba soroljuk (pat4 és pat7 típusú NLS-ek). A klasszikus *monopartite* NLS-ek közé tartozik például a *Simian Vacuolating Virus-40* (SV40) T-antigén NLS-e, míg például a nukleoplazminnak klasszikus *bipartite* NLS-e van. A klasszikus NLS-eket az importin α ismeri fel és szállítja a sejtmagba [91,95]. A nem klasszikus NLS-ek közé több, igen különböző szekvenciájú NLS tartozik. Ilyen például az M9 szekvencia, amely a hnRNP (*heterogenous nuclear ribonucleoprotein*) fehérje 38 aminosav hosszúságú NLS-e. Ezt a szekvenciát a karioferin $\beta 2$ nevű karrier fehérje ismeri fel és szállítja a sejtmagba. A karioferin $\beta 2$ emellett felismeri és szállítja a PY-NLS-sel rendelkező fehérjéket is. A PY-NLS egy hosszabb hidrofób és/vagy pozitívan töltött, rendezetlen szekvencia, amelynek C-terminálisán az R/K/H X(2-5) PY konszenzus szekvencia található. Hasonlóan hosszú, többnyire hidrofób NLS-e van a hnRNP K, a Nab2, a HuR és az Ikb α fehérjéknek [95,96]. Rövidebb, ám nem a klasszikus típusba sorolható NLS-e van a Sam68 és

Cdc6 fehérjéknek. Nemrégiben a GR-motívumról is bizonyították, hogy sejtmagi akkumulációt közvetít az FGF-2 receptor fehérje esetében. Összességében tehát elmondható, hogy a klasszikus, jól körülhatárolt és jellemzett nukleáris lokalizációs szignálok mellett számos más, különböző felépítésű szekvencia is képes sejtmagi dúsulást előidézni [95].

6.3 A sejtmagi transzport jellemzése

A nukleáris pórus komplexen történő átlépés természete alapján megkülönböztetünk diffúzió alapulót és aktív transzportot. A nukleáris pórus komplex kisméretű fehérjék számára, kb. 60 kDa és/vagy 9 nm átmérő alatt áteresztő, felette viszont a fehérjék csak specifikus szállító fehérjék (például: β -karioferin család) segítségével juthatnak a sejtmagi kompartmentumba [81,91,97]. Passzív transzportnak nevezzük, ha egy fehérje a diffúzió eredményeként jut át a nukleáris pórus komplexen, de ott valamely sejtmagi komponenshez való kötődés révén dúsul. A sejtmagi komponenshez történő kötődést közvetítő szekvenciát nukleáris retenciós szignálnak is nevezzük. Bizonyos kis fehérjék esetében az aktív és passzív transzportfolyamatok egymás mellett, egy időben is lejátszódhatnak (például: hiszton fehérjék). Aktív transzport esetében különböző karrier fehérjék biztosítják az adott fehérje sejtmagban történő dúsulását. A karrier fehérjék a nukleáris pórus komplexek FG nukleoporinjainak segítségével juttatják át a póruson a fehérjéket, majd a sejtmagi oldalon szétesik a komplex és a karrier fehérjék specifikusan visszakerülnek a citoszolba [97,98].

II. CÉLKITŰZÉSEK

Az irodalmi bevezetésben bemutatott eredmények alapján úgy gondoltuk, hogy mind a prion fehérjecsalád funkciójának, mind pedig a szivacsos agysorvadás betegségek patomechanizmusának megértése szempontjából érdekes lehet, ha azonosítjuk azokat a folyamatokat, amelyekben a Shadoo fehérje részt vesz. Ennek a célnak az elérésében a Shadoo fehérje lokalizációjának ismerete fontos információ.

Doktori munkám elsődleges célja a prion fehérje család legújabb tagja, a Shadoo fehérje sejtszintű lokalizációjának vizsgálata volt mind antitestek, mind pedig fluoreszcens fúziós konstrukciókkal, különös tekintettel a prion fehérje lokalizációjával való azonosságokra és/vagy eltérésekre.

Kezdeti eredményeink alapján elmondható volt, hogy a prion fehérjéhez hasonlóan a Shadoo fehérje is kettős, sejtmagi és plazmamembrán lokalizációt mutató fehérje. Kutatásaink középpontjába így a Shadoo fehérje kettős lokalizációja került, melyet különböző mutáns konstrukciókkal kívántuk pontosabban jellemezni. Célul tűztük ki az alábbi kérdések megválaszolását:

- 1.) Mely szekvencia felelős a Shadoo fehérje sejtmagi dúsulásáért, van-e a Shadoo fehérjének a prion fehérjéhez hasonlóan nukleáris lokalizációs szignálja?
- 2.) Hozzájárul-e aktív folyamat a Shadoo és prion fehérjék sejtmagi dúsulásához?
- 3.) Van-e valamilyen sejtmagi kötőpartnere (például: nukleinsavak) a Shadoo fehérjének?
- 4.) Történik-e endoproteolitikus hasítás a Shadoo fehérjében, amennyiben igen, mely régiójában és ez kapcsolatba hozható-e a kettős lokalizációval?
- 5.) A Shadoo fehérje vagy annak a sejtmagban megjelenő része milyen útvonalon kerül a sejtmagba? Ha a szekréciós útvonallal kerül ki, akkor annak mely pontjáról (például: ER vagy Golgi ciszternák) léphet ki?

Mindezen munkákhoz szükséges volt új molekuláris biológiai és biokémiai módszerek kifejlesztésére:

- 6.) Dublőr enzimek általános és speciális használata klónozási munkák könnyítésére;
- 7.) Dublőr enzim adatbázis, enzimkereső és primer tervező program elkészítése;
- 8.) Az agaróz gélshift módszer finomítása és beállítása.

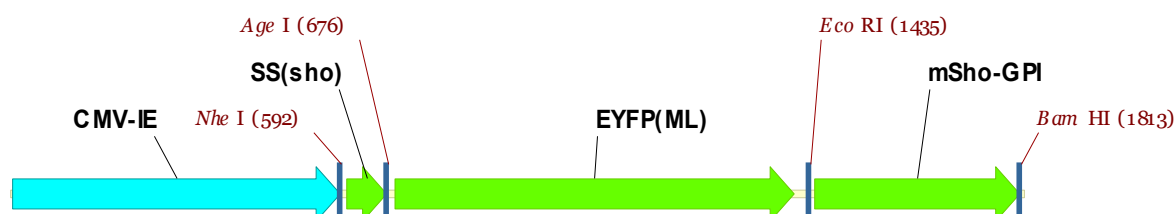
III. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Megjegyzés: a kísérletekhez felhasznált legtöbb vegyszert a Sigma-Aldrich cégtől vásároltuk. Amennyiben nem, a felhasznált anyag után zárójelben ezt külön jeleztem.

1. Plazmid konstrukciók és klónozási technikák

A klónozáshoz felhasznált enzimeket a Thermo Scientific-től, illetve a New England Biolabs-től vásároltuk.

GFP-, YFP-fúziós konstrukciók létrehozásához a pEGFP-C1, illetve a pEYFP-C1 (Clontech) kiindulási alapvektorokat használtuk. N-terminálisan általában az *NheI* és *AgeI* restrikciós helyeket (7. ábra), míg C-terminálisan a poliklónozó helyen található *EcoRI* és *BamHI* (7. ábra), illetve *BglIII* és *SacI* helyeket használtuk. Az egyes klónozások adatai a Függelékben található F1-es táblázatban vannak felsorolva (felhasznált primerek, klónozási technika, kiindulási vektor).



7. ábra A YFP-Sho fúziós konstrukció készítésekor felhasznált hasítóhelyek elhelyezkedése

A IV./1.1.1.1 fejezetben részletesen kifejtett YFP-Sho vektor készítéséhez felhasznált restrikciós enzim hasítóhelyek és a vektor eukarióta expressziós kazettájának részletes bemutatása. CMV-IE: citomegalovírus promóter, SS(sho): a Shadoo fehérje szekréciós szignál szekvenciája, EYFP: enhanced yellow fluorescent protein, kezdő metioninja leucinra lett cserélve (ML), mSho: egér Shadoo core szekvencia, GPI: GPI-horgony szignál szekvencia. A kép a VectorNTI program (Life Technologies) segítségével készült.

A GFP- β -galaktozidáz és az NLS^{x3SV40}-GFP- β -galaktozidáz konstrukciókat Y. Lazebniktől kaptuk [99]. Ezen konstrukciókból készítettük például Sho-GFP- β -Gal, (RXXX)₈-GFP- β -Gal, illetve a PrP-GFP- β -Gal konstrukciókat, az N-terminális XhoI és XbaI helyek közé illesztettük a Shadoo és prion fehérjék *core* szekvenciáját, illetve az N-terminális (RXXX)₈ motívumot (további konstrukciók és részletek a Függelék F1-es táblázatában olvashatók).

Fehérje expressziós konstrukciók készítéséhez a pRSETb alapvektort használtuk. Mindegyik konstrukció tartalmazott egy *hexahisztidin tag*-et a tisztítás megkönnyítésére, illetve fúziós partnerként az mCherry fehérjét. A vizsgálni kívánt szekvenciák (Shadoo és PrP *core* szekvencia, sNLS, RGG-box, (RXXX)₈ motívum és további Shadoo deléciós mutánsok) illesztéséhez a BsmBI és HindIII restrikciós helyeket használtuk.

A PCR mutagenézis reakciók a Quickchange *Site-directed Mutagenesis* (Stratagene) protokollja alapján készültek. A PCR reakció templátjául szolgáló plazmid DNS-t minden esetben DpnI restrikciós enzimmel elimináltuk.

Az elkészült konstrukciókat *Escherichia coli* DH5 α , Top10, illetve ahol indokolt volt Stbl3 baktériumtörzsekbe transzformáltuk. Felhasználás előtt minden konstrukciót szekvenáltattunk. A felhasznált oligonukleotidok szintézisét és a szekvenálásokat a Microsynth AG (<http://www.microsynth.ch/>) végezte.

A továbbiakban az EYFP/EGFP megnevezések helyett csak röviden YFP/GFP neveket, az mCherry helyett pedig Cherry nevet használók.

2. Online dublőr enzim-kereső és primer tervező program

A dublőr enzim adatbázisunkhoz olyan Type IIS restrikciós endonukleázokat válogattunk ki, amelyek a felismerő helyünkön kívül hasítanak, mindezt megfelelő hatékonysággal és pontossággal és ahol a keletkezett túlnyúló végek kiválóan újraligálhatóak. Az enzimeket a New England Biolabs REBASE adatbázisából (<http://rebase.neb.com/rebase/>) [100], a Thermo Scientific (<http://www.thermoscientificbio.com/>) kereskedelmi forgalomban

kapható enzimeiből és az EURX cég oldaláról (<http://www.eurx.com.pl/>) manuálisan, minden enzimet egyesével ellenőrizve válogattuk össze.

A program a megadott, leendő PCR inszert szekvencia analizálása után kiválasztja az összes olyan dublór enzimet, melyeknek nincsen felismerő helye az inszert szekvenciájában és az előre megadott túlnyúló véget létre tudják hozni. A dublór enzimek közül a rövidebb primert igénylők kerülnek előbbre. A program ezután összeállítja a szükséges *forward* és/vagy *reverse* primereket és ezeket 5' → 3' irányban tünteti fel. Mindkét esetben kétféle primer terv is készül, az egyik esetében a felismerőhely a hasítást követően megmarad az inszert szekvenciájában, a másik esetben pedig levágódik. A primer 5' vége további bázisokat tartalmazhat (1-6 nukleotid), melyek a restrikciós enzim megfelelő illeszkedéséhez és ezáltal a hatékony hasításhoz szükségesek.

A dublór enzimek használatát megkönnyítő primer tervező programunk Javascript programozási nyelven készült és az alábbi linken érhető el: http://group.szbk.u-szeged.hu/welkergr/body_double/index.html.

3. Sejtkultúrák

A kísérletekhez a következő sejtvonalakat használtuk: BE(2)-M17, Cos-7, HeLa, Hpl3-4, Hw13-3, K562, N2a, SH-SY5Y, Zpl2-1, Zw3-5

A sejteket (HeLa, SH-SY5Y, Cos-7, N2a, Zpl2-1, Zw3-5 [101], Hpl3-4, Hw13-3 [102]) 37 °C-on, 5% CO₂ atmoszférában, *High-glucose Dulbecco's Modified Eagle* médiumban (DMEM, Lonza) növesztettük, amelyhez 10% hőinaktivált FBS-t (*fetal bovine serum*, Lonza), 100 unit/ml penicillint (Lonza) és 100 µg/ml sztreptomicint (Lonza) adtunk.

A K562 sejteket *Roswell Park Memorial Institute Medium* (RPMI)-1640-ben növesztettük, melyhez 2 g/l nátrium-bikarbonátot, 10% hőinaktivált FBS-t, és 1% GlutaMaxot (Gibco) adtunk.

BE(2)-M17 sejteket *Ham's F-12 Nutrient Mixture* médium és *Advanced MEM* (*Advanced Minimum Essential Medium*) (Invitrogen), 1:1 arányú keverékében növesztettük, amelyhez 2mM glutamint (Lonza), 15% hőinaktivált FBS-t adtunk.

A Zpl2-1, Zw3-5 [101], Hpl3-4, Hw13-3 [102] sejtvonalak immortalizált hippokampális sejtvonalak, amelyeket Y. S. Kim és T. Onodera bocsátottak rendelkezésünkre.

4. Transzfekció

Transzfekció előtt egy nappal a sejteket Labtek II 8-well kamrákra (konfokális mikroszkópos kísérletekhez), illetve 6-well plate-ekre (Western blotokhoz) osztottuk (2×10^4 sejt/well, 3×10^5 sejt/well). A kiosztást követő napon, nagyjából 30-50%-os konfluenciánál a sejteket Turbofect reagens (Thermo Scientific) segítségével a kiválasztott plazmid konstrukcióval transzfectáltuk. A transzfekciós elegy 500 ng / 4000 ng cirkuláris plazmid DNS-t, 1 μ l / 4 μ l Turbofect reagenst és 50 μ l / 400 μ l DMEM-et tartalmazott. Az elegy 20 perc szobahőn történő inkubálás után került a sejtek médiumába. A sejtek médiumát a transzfekciót követően 3 órával lecseréltük.

5. Immuncitokémia

A transzfekciót követő második napon a sejteket PBS-sel (*phosphate buffered saline*, összetétel: 137 mM NaCl, 16 mM Na₂HPO₄, 6,4 mM KH₂PO₄, pH= 7,2) mostuk, majd 4%-os paraformaldehid oldattal fixáltuk szobahőmérsékleten 10 percig. A fixálást követően a sejteket háromszor 5 percig IF oldattal (immunfluoreszcens oldat, 0,1% Triton X-100-t, 0,2% BSA-t (*bovine serum albumine*) tartalmazó PBS) mostuk. A mosásokat követően a mintákat 0,6% Triton X-100-t és 5,2% BSA-t tartalmazó PBS-sel blokkoltuk és permeabilizáltuk. A blokkolás és permeabilizálás után a sejteket ismét háromszor IF oldattal mostuk, majd 1 órán át inkubáltuk az elsődleges antitest [R-12 (Santa Cruz), S-12 (Santa Cruz), AG (Abgent), RP62 (Eurogentec), anti-fibrillarin C13C3 (Cell Signaling Technology)] IF oldatos hígításában. Egy mosási lépést követően az elsődleges antitesthez választott fluoreszcens marker konjugált másodlagos antitest [anti-rabbit DyLight649 (Pierce) 1:400] IF oldatos hígításában inkubáltuk a mintákat fél órán át. Három mosási lépést követően a minták egy

éjszakán át 4°C-on álltak IF oldatban a háttér csökkentése miatt. A sejtmagok festéséhez 5 µM Hoechst 33342 (Invitrogen) festéket használtunk.

6. Kezelések

4°C-os hűtés: A sejtek médiumát előre hűtött PBS oldatra cseréltük, majd 2 órán át hűtőben 4°C-on és 2 órát jeges víz keverékében tartottuk az irodalomban leírt protokoll alapján [103]. A kezelést követően a sejteket előre hűtött 4%-os paraformaldehid PBS-es oldatával fixáltuk 10 percen át.

2-dezox-D-glükóz (DEG) (F1. ábra): A sejtek médiumát szobahőmérsékletű 10 µM-os 2-dezox-D-glükózt és 10 µM NaN₃-t (Fluka) tartalmazó PBS oldatra cseréltük, majd 1 órán át szobahőmérsékleten állni hagytuk [103]. A kezelést követően a sejteket 4%-os paraformaldehid PBS-es oldatával fixáltuk 10 percen át.

Brefeldin A (BFA) (F1. ábra): A sejtek médiumához 5 µg/ml-es végkoncentrációban Brefeldin A-t adtunk, majd a sejteket visszahelyeztük a 37°C-os CO₂ termosztátba 5 órára. A kezelést követően a sejteket 4%-os paraformaldehid PBS-es oldatával fixáltuk 10 percen át.

Eeyarestatin 1 (EeyI) (F1. ábra): A sejtek médiumához 8 µM Eeyarestatin I-t (Calbiochem) tartalmazó DMSO-t (dimetil-szulfoxid) adtunk, majd a sejteket visszahelyeztük a 37°C-os CO₂ termosztátba 4 órára. A kezelést követően a sejteket 4%-os paraformaldehid PBS-es oldatával fixáltuk 10 percen át.

7. Konfokális mikroszkópia

A kísérletek kiértékelése Olympus FV1000 konfokális lézer pásztázó mikroszkóppal történt. A mikroszkóp beállításai a következők voltak: PLAPO 60x (NA: 1.4) olaj immerziós

objektív (Olympus); szkennelési mód: szekvenciális, 2x kalmaan; a különböző markerek, fúziós partnerek gerjesztése és detektálása: Hoechst 33342 405 nm / 430-460 nm, EGFP: 488 nm / 505-525 nm, EYFP: 515 nm / 535-555 nm, mCherry 543 nm / 560IF, DyLight649 633nm / 610IF; a Hoechst 33342 és EYFP-t tartalmazó minták esetében BS20/80 dikroikus *beam splitter*-t használtam és SMD 505-ös köztes dikroikus tükröt, a Hoechst 33342 és EGFP-t tartalmazó minták esetében DM 405/488-as dikroikus tükröt és SMD 505-ös köztes dikroikus tükröt, a Hoechst 33342, EGFP és mCherry-t tartalmazó minták esetében DM 405/488/543/633-as dikroikus tükröt és SMD 505 és SMD 560IF-es köztes dikroikus tükröket, a Hoechst 33342, EYFP és DyLight649-et tartalmazó minták esetében pedig BS20/80 dikroikus *beam splitter*-t és SMD 505 és SMD 630IF-es köztes dikroikus tükröket. Az áteső fényes képek a 405 nm-es lézer segítségével készültek.

A képek kiértékelése Fluoview 1.7b (Olympus) szoftverrel történt. *Well*-enként 100-300 sejtet számoltam és minden kísérletet legalább háromszor ismételttem.

8. Western blot

6-well *plate*-n növesztett és transzfektált sejteket, a transzfekciót követő második napon PBS-sel mostuk, majd sejtkaparóval felszedtük és centrifugáltuk 110 g-n 5 percig 4°C-on. Centrifugálást követően a sejteket Harlow pufferrel (50 mM Hepes pH 7,5, 0,2 mM EDTA, 10 mM NaF, 0,5% NP40, 250 mM NaCl, Proteináz inhibitor koktél 1:100) lizáltuk. Bizonyos mintákat ezután 2 órán keresztül 37°C-on PNGase F-fel (Thermo Scientific) emésztettük.

A mintákat 95°C-on forraltuk 5 percig, majd 10%, illetve 12,5%-os akrilamid tartalmú SDS-gélen futtattuk őket. A géleket nedves blottolóban 250 mA-en másfél órán át vittük át PVDF membránra (Millipore). A membránokat ezután 5%-os sovány tejporból készült oldattal blokkoltuk 2 órán keresztül. A membránokat az elsődleges antitesttel (anti-GFP/YFP 1:3500, Central European Biosystems) 4°C-on inkubáltuk egy éjszakán át, majd ezután a másodlagos antitesttel (anti-rabbit HRP 1:40,000, Pierce) szobahőmérsékleten 1 órát. A

fehérje *band*-eket ECL Luminol reagens (Immobilon Western HRP Substrate Luminol Reagent, Millipore) oldattal hívtuk elő.

9. Fehérje expresszió és tisztítás

A bakteriális fehérje expresszióhoz *Escherichia coli* BL21 DE3 pLysS törzset használtunk. Az expressziót megelőző napon frissen transzformáltam a kloramfenikol rezisztenciával rendelkező baktérium sejteket 10 ng DNS-sel. A friss transzformánsokból 300 ml Luria Bertrani (LB) médiumba oltottam le egy-egy telepet. Amikor a baktériumkolónia elérte a 0,5-0,7 közötti OD₆₀₀-as értéket, a fehérje expressziót 70 mg IPTG (izopropil-β-D-tiogalaktopiranozid) (Thermo Scientific) hozzáadásával indítottam el. Az expresszió ezután 30°C-on történt 220 rpm-en rázatva egy éjszakán át. Másnap a sejt kultúrát 4500 g 10 percig 4°C-on centrifugáltuk, majd a pelletet 4°C-on háromszor 45 másodpercig ultrahangos kezelésnek vetettük alá. Ezt követően a sejt törmelékét centrifugáltuk 13200 g-n, 4°C-on fél óra alatt. Az expresszált és vizsgálni kívánt fehérjénk a felülúszóban volt megfigyelhető. A Cherry jellegzetes rózsaszín színét könnyen nyomon tudtuk követni.

10. Agaróz gélshift

A fehérje-nukleinsav kötés detektálására agaróz gélshift módszert alkalmaztunk. A fúziós fehérjét *hexahisztidin tag* segítségével nikkkel gyöngyökhöz kötöttük (1 óra, 4°C, forgatás), a felülúszótól pedig foszfát pufferes (0,05 M Na₂HPO₄, 0,1 M NaCl, pH=8,0) mosással szabadultunk meg. A fehérje mintát RNáz A és/vagy DNáz I (Life Technologies) kezelésnek vetettük alá (30 perc, 37°C), hogy megszabaduljunk az esetlegesen a mintához kötött nukleinsavaktól. A felesleges enzimektől szintén foszfát pufferes mosási lépésekkel szabadultunk meg. A kötés egy éjszakán át 4°C-on 50 µl végtérfogatban zajlott, másnap

háromszori mosással megszabadultunk a felesleges nukleinsavaktól, a mintákhoz 10 µl 6x DNS *Loading Dye*-t (Thermo Scientific) adtunk, majd 1%-os agaróz (Lonza) gélen 135 mV-on 45 percig futtattuk a mintákat. A Cherry fúziós fehérje sávokat látható fényen detektáltuk. Ha szükséges volt, akkor a nukleinsavakat etídium-bromiddal festettük és UV fényben vizsgáltuk.

11. Bioinformatika

A bioinformatikai analízishez 33, az analízis készítésének idejében elérhető gerinces faj Shadoo szekvenciáját használtuk fel, melyeket az UniProt adatbázisból [2] a “shadoo” és “shadow” keresőszavakkal gyűjtöttünk ki (UniProt ACs: A2BDG9, Q5TJB9, Q5BIV6, A2BDJ8, Q1JPW9, A2BDJ9, A2BDG5, A2BDG0, A2BDG4, C6ETC7, C6ETD1, A0RZB4, C6ETD7, C6ETD2, C6ETC9, C6ETC6, C7DLK9, C6ETD0, C6ETC8, A6XN32, C5H878, A2BDG2, A2BDJ4, A2BDG7, Q8BWU1, C6ETC5, Q5BIV7, A2BDG8, A2BDJ5, A2BDG6, A2BDH0, A2BDG1, Q5BIV9). Az elemzéshez a következő szoftvereket használtuk: Clustal Omega [104], Jalview [105], Weblogo [106]. Többféle módon is próbáltunk az (RXXX)₈ motívumhoz hasonló szekvenciákat találni: i) BLAST [107] keresés az UniProtKB adatbázisban található fehérjék között, ii) mintázat alapú keresés Perl script segítségével, iii) aminosav összetétellel kombinált mintázat alapú keresés Perl script segítségével, iv) rejtett Markov model segítségével (HMMER) [108].

12. Statisztika

A lokalizációt a következőknek megfelelően értékeltük:

- **kizárólagos sejtmagi dúsulás:** a sejtmagi dúsulás mellett a citoszolikus lokalizáció elhanyagolható

- **sejtmagi dúsulás:** sejtmagi dúsulás mellett a citoszolikus lokalizáció is jelentős
- **sejtmagi lokalizáció:** az előző két opció együttese
- **homogén lokalizáció:** a sejtmagi és a citoszolikus szignál közel azonos intenzitású
- **citoszolikus lokalizáció:** csak a citoszolban figyelhető meg a vizsgált fehérje, a sejtmagból kizáródik
- **plazmamembrán**

Kísérletenként legalább 100-300 sejtben vizsgáltuk a lokalizációt és minden minta esetében legalább három ismétlést végeztünk. A minták normál eloszlását Kolmogorov-Smirnov teszttel ellenőriztük és az egyes mintákat Student-féle t-teszttel hasonlítottuk össze (SPSS 9.0 Statisztika Program). Szignifikáns különbséget állapítottunk meg, ha p értéke: * $0,01 < p < 0,05$; ** $0,001 < p < 0,01$; *** $p < 0,001$ volt.

IV. EREDMÉNYEK

1. Prokarióta és eukarióta expressziós DNS konstrukciók készítése

1.1 Az alkalmazott klónozási stratégiák ismertetése egy-egy példa klónozáson

1.1.1 Különböző inszert klónozási stratégiák

A kiválasztott vektorba beilleszteni kívánt inszertet különféle módokon is előállíthatjuk. Egyrészt a megfelelő primerekkel PCR reakcióval, másrészt előre szintetizált oligókkal, harmadrészt a legegyszerűbb módon restrikciós endonukleázokkal történő hasítással egy másik vektorból. Az ilyen módokon előállított inszertet ezután a megemésztett befogadó vektorba illesztjük és a létrejött új cirkuláris plazmidokat baktérium sejtekbe transzformáljuk, majd a különböző klónokat tesztelési módszerrel ellenőrizzük, és a megfelelő emésztési mintázatot mutatókat szekvenálással is megerősítjük. A következő fejezetekben mindhárom inszert előállítási módra hozunk egy-egy példát, a további klónozások adatait a Függelék F1-es táblázatában adtuk meg.

1.1.1.1 A YFP-Sho konstrukció készítése PCR inszerttel

A YFP-Sho konstrukció több lépésben készült. Első körben a pEYFP-C1 C-terminális klónozó helyre EcoRI és BamHI restrikciós helyek közé illesztettük az egér Shadoo core és GPI-horgony szignál szekvenciáját, második lépésben pedig a szekréciós szignál szekvencia került az EYFP N-terminálisán található NheI és AgeI restrikciós helyek közé (7. ábra). A szignál szekvenciát tartalmazó inszert előállításához az alábbi primereket használtuk: *forward primer*: AAGGGCTAGCCACCATGAACTGGACTGCTG, *reverse primer*: GGGGGGACC GGTAAGGCGCTACAGCTGTCA. A *forward primer* tartalmazza az eukarióta expresszióhoz szükséges kozak szekvenciát a kezdő ATG-t megelőzően (kék betűkkel jelölve a primerben). A PCR reakció esetében az *annealing* hőmérséklet 46°C volt és a PCR protokoll 40 cikluson keresztül ismétlődött. A PCR reakcióban Pfu polimerázt (Thermo

Scientific) használtunk, melynek optimális működési hőmérséklete 72°C. A PCR terméket és a befogadó vektort a reakciót követően NheI és AgeI enzimekkel emésztettük, majd a megfelelő fragmenteket T4 ligáz enzimmal (Thermo Scientific) illesztettük össze (inszert : vektor arány = 3 : 1). A háttér csökkentésére a ligálást követően Eco47III emésztést alkalmaztunk. Az Eco47III restrikciós enzim a ligált termék plazmidot nem hasítja, viszont a kiindulási, befogadó vektorban rendelkezik felismerő hellyel. A ligátumot *Escherichia coli* DH5α kompetens sejtekbe transzformáltuk. A kapott telepeket egy éjszakán át növesztettük, izoláltuk a plazmid DNS-t, majd az előre kiválasztott restrikciós enzim(ek)-mel ellenőriztük, hogy valóban az általunk készített plazmid konstrukciót tartalmazzák. A tesztelés alapján megfelelőnek talált klónokat szekvenálással is ellenőriztük.

1.1.1.2 A GFP-sNLS konstrukció készítése linker inszerttel

A GFP-sNLS konstrukció úgy készült, hogy a pEGFP-C1 alapvektorba EcoRI és BamHI restrikciós helyekre egy előre szintetizáltatott linkert illesztettünk be. A linker az alábbi két, egyszálú oligonukleotid hibridizálásából készült: AATTCACGCGGAGGAGCTC GAGGTAGTGCACGGGGGTAAG; GATCCTTACCCCCGTGCACTACCTCGAGCTCCT CCGCGTG. Az oligonukleotidokat úgy terveztük, hogy a hibridizálást követően a megfelelő túlnyúló végek emésztés nélkül álljanak elő. A hibridizálás 95°C-ról 4°C-ra történő hűtéssel zajlott másfél óra alatt. A duplaszálú linker inszertet ezután a már megemésztett befogadó vektorba ligáltuk (50 ng vektorhoz 1 µl 500 µM-os linker). A munka menete innentől hasonlóan zajlott az IV./1.1.1.1 fejezetben leírtakhoz.

1.1.1.3 A GFP-(Cherry)₄-(RXXX)₈ konstrukció készítése

A GFP-(Cherry)₄-(RXXX)₈ konstrukció úgy készült, hogy a GFP-(RXXX)₈ vektorba illesztettük a négy tandem Cherry-t tartalmazó fragmentet. A befogadó vektor a GFP-(RXXX)₈, a beilleszteni kívánt inszert a GFP-(Cherry)₄ plazmidból készült BglII és SacI emésztéssel. A kapott fragmenteket az IV./1.1.1.1 fejezetben bemutatottak alapján illesztettük össze.

1.1.1.4 Irányított mutagenézis bemutatása a YFP-Sho konstrukción

Bizonyos változtatások megvalósítására a legegyszerűbb módszer az irányított mutagenézis reakció használata. Ezzel a módszerrel készítettem el a metionin > leucin cserés mutáns konstrukcióimat az alternatív transzlációs iniciáció kiküszöbölésére (lásd IV./2.1 fejezet). A módszer egy PCR reakción alapul, melyben a primereket úgy tervezzük, hogy a módosítani kívánt szekvencia két oldalára illeszkedjenek, közrefogva a módosított szekvenciát. A PCR reakcióban tehát olyan cirkuláris plazmidok fognak készülni, melyek tartalmazzák a módosításokat. Ezek a módosítások lehetnek inszerciók, deléciók, illetve báziscserék is. A metionin > leucin cserés konstrukciók elkészítéséhez a kezdő metionin ATG szekvenciáját a leucin TTG kodonjára cseréltem. A mutagenézisek kivitelezéséhez az alábbi primereket használtam, *forward primer*: CCGGTCGCGCATTTGGTGAGCAAGGG AGAG; *reverse primer*: CTCTCCCTTGCTCACCAAATGCGCGACCGG. Ezen primerekkel bizonyos konstrukciókban a Shadoo vagy prion fehérje szekréciós szignál szekvenciáját követően, az YFP kezdő metioninjaként szolgáló ATG tripletet lehet TTG-re változtatni. A primereket úgy terveztük, hogy a kitapadó karok olvadási hőmérséklete megközelítőleg megegyezzen, illetve a primerek lehetőség szerint G vagy C bázisra végződjenek. A PCR reakciót követően a templát DNS-t DpnI restrikciós enzimmal emésztettük, majd a reakcióelegyet *Escherichia coli* DH5α kompetens sejtekbe transzformáltuk. A kapott klónokat az IV./1.1.1.1 fejezetben bemutatottak alapján teszteltük.

1.1.2 Dublőr enzimek használata

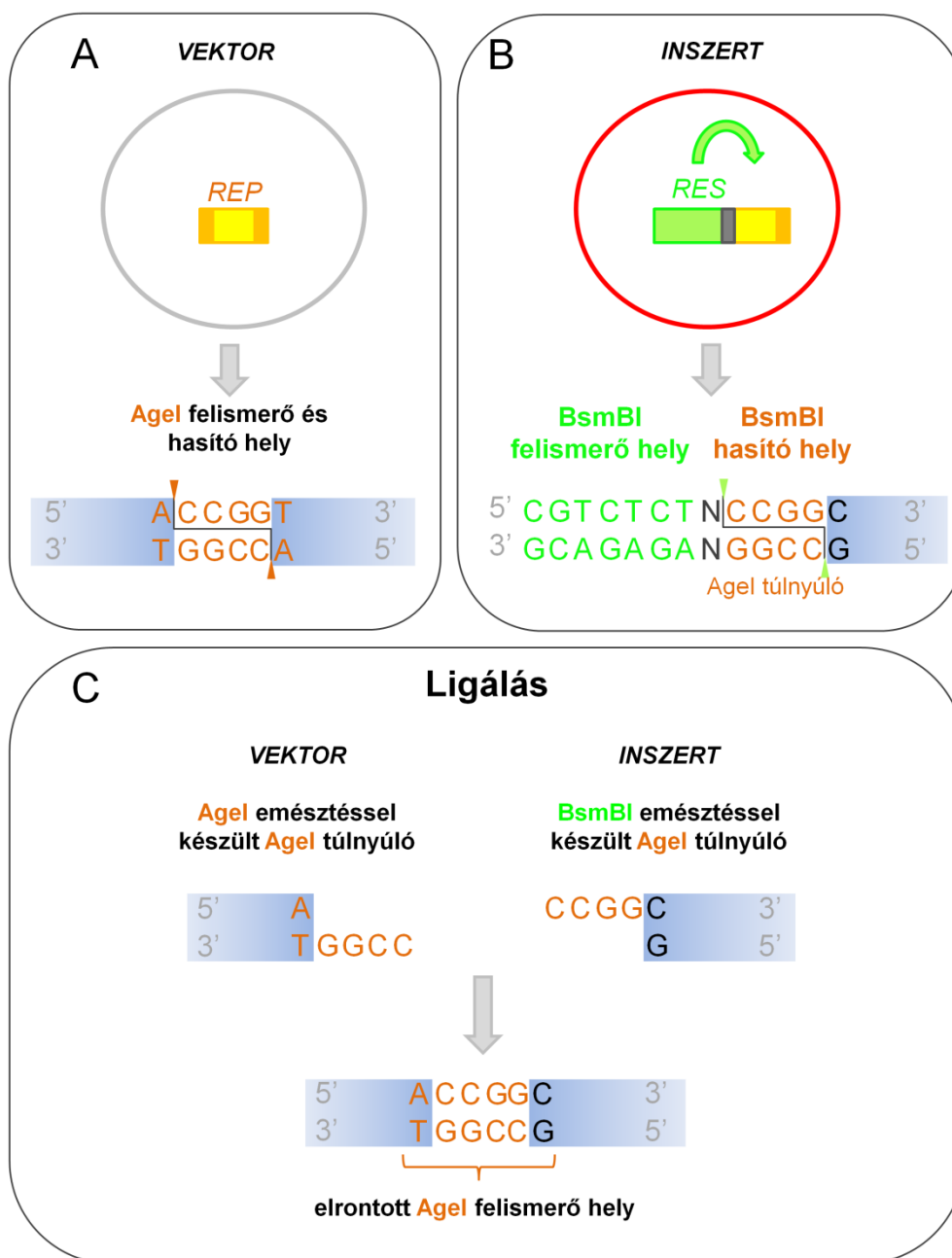
A klónozási munkák során olyan problémába ütköztünk, hogy a vektor felnyitásához és a precíz illesztéshez kiválasztott restrikciós enzimek bizonyos esetekben a beilleszteni kívánt inszertet darabokra vágták. Egy ilyen probléma megoldása az eddigi ismert klónozási stratégiákkal bonyolult, több lépéses folyamatokat vagy nehezen kivitelezhető parciális emésztéses munkákat kíván. Ezek elkerülésére kidolgoztunk egy módszert, amellyel az ilyen problémák egy lépésben, gyorsan és nagy hatékonysággal megoldhatóak. Az inszert emésztéséhez úgynevezett dublőr enzimeket használtunk, amelyeket a IIS típusú restrikciós endonukleázok közül válogattunk össze. Ezen enzimek felismerő helye és hasító helye nem átfedő szekvenciák, ezáltal a hasító hely szekvenciája tetszés szerint változtatható. Ennek a megközelítésnek a használatával bármely tetszőleges szekvencia kialakítható, amennyiben a megfelelő irányú és hosszúságú túlnyúló véget generáló enzimet választjuk. Klónozásaim

során az esetek túlnyomó többségében 5' 4 nukleotid hosszúságú túlnyúló véget vágó IIP típusú restrikciós endonukleázokkal dolgoztam. Ezekhez 11, kereskedelmi forgalomban kapható, megfelelő hatékonysággal működő restrikciós endonukleáz és ezek izoskizomerjei közül válaszhattunk. A módszer kidolgozása során a megfelelő enzim kiválasztásához, illetve a primer szekvenciák könnyebb tervezéséhez egy *online* elérhető programot is készítettünk. A program mindenki számára elérhető a http://group.szbk.u-szeged.hu/welkergr/body_double/index.html címen. A problémákra történő megoldás keresésében, a módszerek kidolgozásában és az adatbázisok összeállításában vettem részt.

IIS típusú dublőr enzimek használatával nemcsak a fentebb említett gyakran felmerülő probléma oldható meg, hanem számos egyéb esetben is hasznosak. Például a segítségükkel könnyebbé tehetők azok a klónozások, amelyekben a befogadó vektort egy restrikciós endonukleázal nyitjuk fel (lásd 1.1.3.1-es fejezet), segítségükkel létrehozhatunk *unique* helyeket vagy megszüntethetünk restrikciós endonukleáz felismerő helyeket, illetve pufferösszeférhetetlenség esetén az amúgy kétlépéses, időigényes emésztési reakció is egylépéssé tehető.

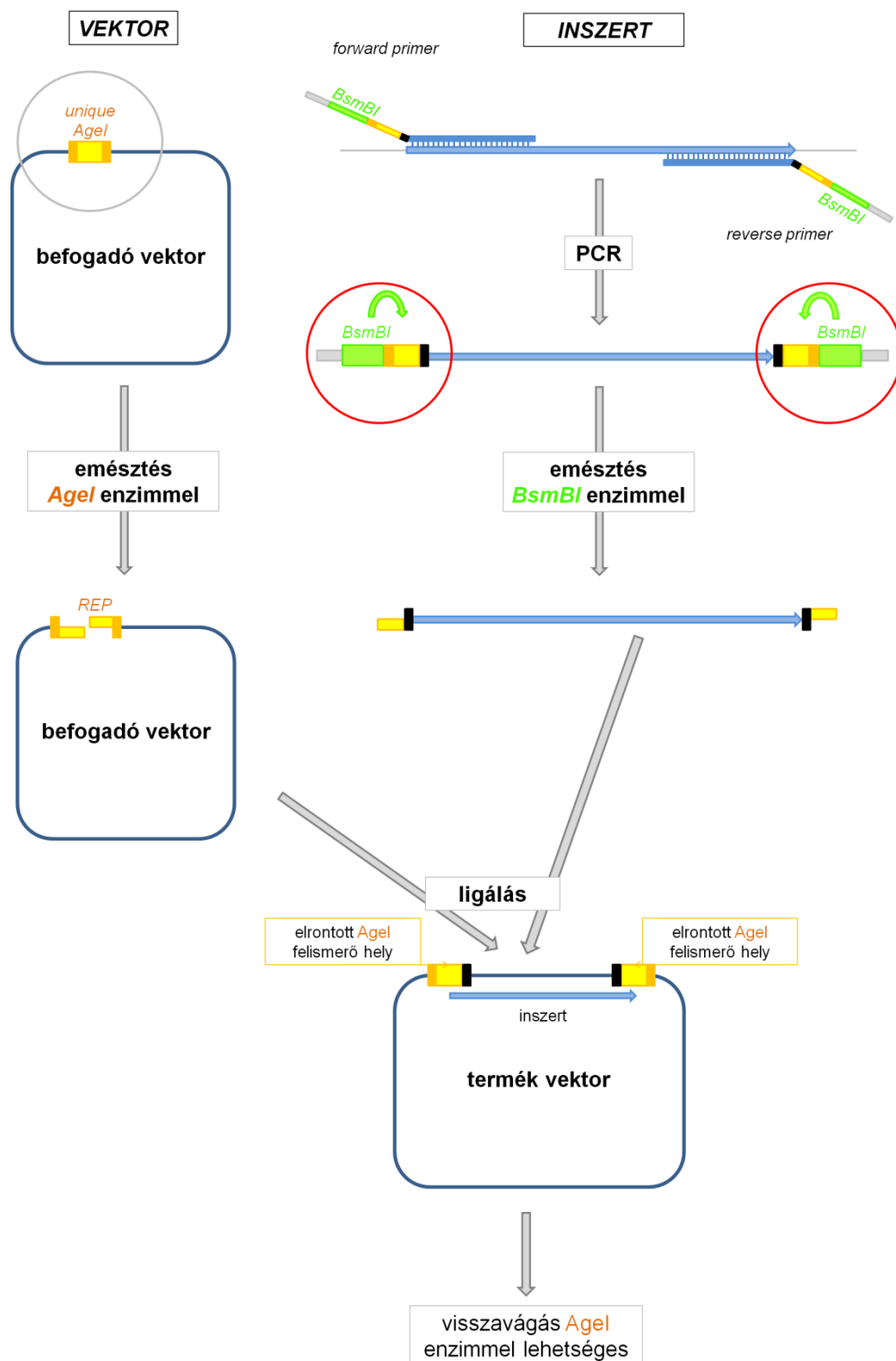
1.1.3.1 A Sho-NLS-YFP konstrukció készítése dublőr enzimekkel

A Sho-NLS-YFP konstrukciót úgy készítettük el, hogy a Sho-YFP vektorba a Shadoo *core* szekvenciáját követő *unique* AgeI helyre illesztettük be a három tandem SV40 nagy T-antigén NLS-t tartalmazó szekvenciát. Amennyiben a befogadó vektort egy helyen nyitjuk fel úgy a későbbiekben a kiindulási vektorból származó, sokszor jelentős mennyiségű háttér nem eliminálható, ezáltal sokkal kisebb arányban kapunk termék plazmidot. Ezért a PCR inszerten az AgeI túlnyúló végeket (aláhúzott szekvencia a primerekben) BsmBI dublőr enzimmel alakítottuk ki (felismerőhelyét dőlt betűvel jeleztem a primerekben) és úgy terveztük meg, hogy a termék plazmidhoz történő ligálás ne adjon vissza a kiindulási AgeI helyet (8. ábra, 9. ábra). A felhasznált primerek: *forward primer*: GGGGGGCCGGAGAGACGCGCAGATCCA AAAAAGAAG, *reverse primer*: GGGGGGCCGGGGAGACGTTATCTACCTTTCTCTTCTT. A PCR reakció hibridizációs hőmérséklete 48°C volt, a reakció 40 cikluson keresztül végeztük. A PCR inszertet BsmBI restrikciós enzimmel, míg a befogadó vektort AgeI enzimmel emésztettük (8. ábra, 9. ábra).



8. ábra AgeI túlnyúló készítése AgeI és BsmBI emésztéssel

A.) A befogadó vektorban az AgeI (narancssárga) túlnyúló véget AgeI emésztéssel alakítjuk ki. REP = IIP típusú restrikciós endonukleáz; B.) A PCR inszertet azonban a választott dublőr enzimmal (BsmBI - zöld) emésztjük. A PCR primert előzetesen úgy terveztük, hogy a BsmBI enzimmal történő emésztés AgeI túlnyúlót alakítson ki. RES = IIS típusú restrikciós endonukleáz; C.) Az így kialakított túlnyúlók ligálhatóak. Előzetes tervezéssel megválasztható, hogy a termék plazmidban a kiindulási AgeI hely megmaradjon-e. Az ábrán azt az esetet mutatom be, amikor a termék plazmidban az AgeI helyet nem kapjuk vissza.



9. ábra A Sho-NLS-YFP konstrukció készítése dublór enzimmal

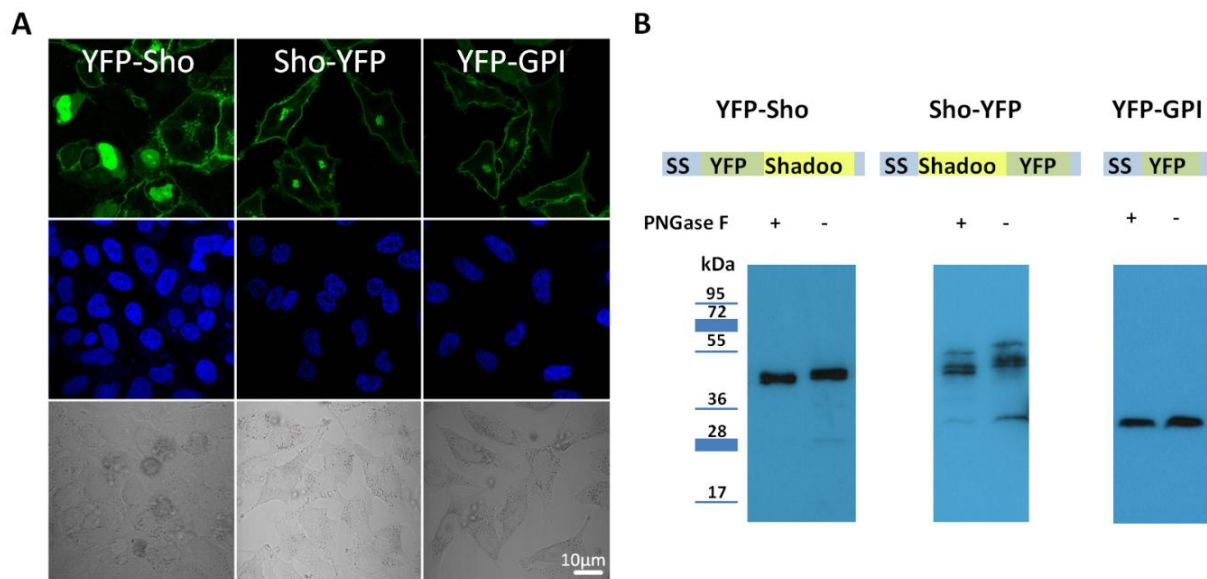
Ha a befogadó vektort egy enzimmal (AgeI – narancssárga) nyitjuk fel, akkor a klónozás későbbi lépéseiben a sokszor jelentős háttér eliminálására nincs lehetőség. Azonban ha a PCR inszerten a túlnyúlókat dublór enzimmal (BsmBI – zöld) alakítjuk ki és előzetesen úgy tervezzük a primert, hogy a ligálás következtében az eredeti AgeI hely ne jöjjön ismét létre (8. ábrán részletesen bemutatva), akkor AgeI emésztéssel a kiindulási plazmidból származó háttér visszavágható. A piros és szürke körök a 8-as ábra ide vonatkozó részleteire utalnak. REP = IIP típusú restrikciós endonukleáz, RES = IIS típusú restrikciós endonukleáz

2. Kettős sejtszintű lokalizáció a prion fehérjecsaládban

2.1 A Shadoo fehérje kettős sejtszintű lokalizációja

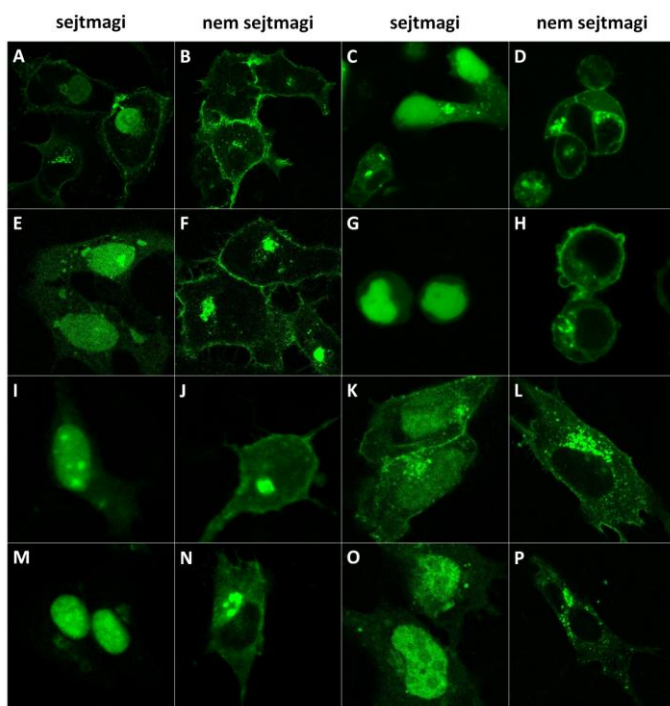
A Shadoo (Sho) fehérje sejtszintű lokalizációjának vizsgálatához elkészítettük a YFP-Sho, a Sho-YFP és a kontroll YFP-GPI fúziós konstrukciókat és lokalizációjukat vizsgáltuk különféle idegi (N2a, SH-SY5Y, Zpl2-1, Zw3-5, Hpl3-4, Hw13-3) és nem idegi (Cos-7, HeLa, K562) eredetű emlős sejtvonalakban. A fúziós konstrukciók a Shadoo *core* szekvenciáján felül még tartalmazták N-terminálisan a Shadoo fehérje szekréciós szignál szekvenciáját és C-terminálisan pedig a Shadoo fehérje GPI-horgony szignál szekvenciáját. A konstrukciók úgy készültek, hogy a YFP kezdő metioninját lecseréltük leucinra az alternatív transzláció iniciáció elkerülésére, ugyanis a második metioninról induló transzláció szekréciós szignál nélküli, szabad riboszómákon szintetizálódó fúziós fehérjéket eredményezne. A Shadoo fehérje szignál szekvenciák alapján a fúziós fehérjét a prion fehérjéhez hasonlóan a sejtmembránban és a szekréciós útvonal különböző állomásain (ER, Golgi ciszternák) vártuk. Érdekes módon azt tapasztaltuk, hogy a Sho-YFP és a YFP-GPI a várt intracelluláris vezikula – feltehetően ER, Golgi ciszterna – és membrán lokalizációt mutatva, ezzel szemben viszont a YFP-Sho kettős lokalizációt mutatott: a szekréciós útvonal és plazmamembrán lokalizáció mellett a sejtek bizonyos százalékában megfigyelhető volt a sejtmagban és a sejtmagvacskában is. A sejtmagvacskában történő lokalizációt anti-fibrillarin festéssel igazoltuk. Bizonyos sejtekben csak sejtmagi dúsulás volt megfigyelhető, míg más sejtekben sejtmagi és membrán lokalizációt egyszerre láttunk (10. ábra, 11. ábra). A kettős lokalizáció nem bizonyult sejtvonal függőnek, ám a sejtmagi forma aránya eltért az egyes sejtvonalakban, legmagasabb értéket HeLa sejtekben tapasztaltunk (~30%). A sejtmagi lokalizáció könnyebb elkülönítésére minden esetben megfestettük a sejtek sejtmagját Hoechst 33342 festékkel. Az expresszálandó fúziós fehérjéket Western blottal is ellenőriztük anti-YFP/GFP antitesttel HeLa sejtekben (10. ábra). PNGase F emésztéssel ellenőriztük, hogy a fehérjék – a kontroll YFP-GPI kivételével – megkapják-e a szekréciós útvonalon a megfelelő cukor oldalláncot. Mind a YFP-Sho, mind a Sho-YFP esetében lehet látni egy enyhe futásbeli eltolódást a PNGase F emésztés hatására. Érdekes módon a Sho-YFP lassabban futott, mint a YFP-Sho annak ellenére, hogy a fúziós konstrukciók becsült tömegében nincs jelentős különbség (YFP-Sho: 38,31 kDa; Sho-YFP: 38,26 kDa), ami ezt indokolhatná. Továbbá többszöri ismétléssel is több sávot tapasztaltunk a Sho-YFP fúziós fehérje esetében, ami arra utal, hogy ez a fúziós

fehérje érzékenyebb különböző proteolitikus hasításokra. A YFP-Sho esetében nem kaptunk olyan eredményt, ami összekapcsolható lenne a kettős lokalizációval.



10. ábra A YFP-Sho, Sho-YFP és YFP-GPI fúziós fehérjék lokalizációja és Western blot képe

A.) A YFP-Sho, Sho-YFP és YFP-GPI lokalizációja HeLa sejtekben. A reprezentatív képek konfokális lézer pásztázó mikroszkóppal készültek (zöld: YFP, kék: Hoechst 33342 festés, szürke: áteső fénnel készült képek). **B.)** A YFP-Sho, Sho-YFP és YFP-GPI konstrukciók sematikus felépítése, SS: szekréciós szignál szekvencia, a C-terminális kék téglalap a GPI-horgony szignált jelöli. Alattuk a teljes hosszúságú (-) és a PNGase emésztett forma (+) Western blot képe látható 12,5%-os SDS-gélen futtatva, majd anti-YFP/GFP antitesttel (1:3500) jelölve.

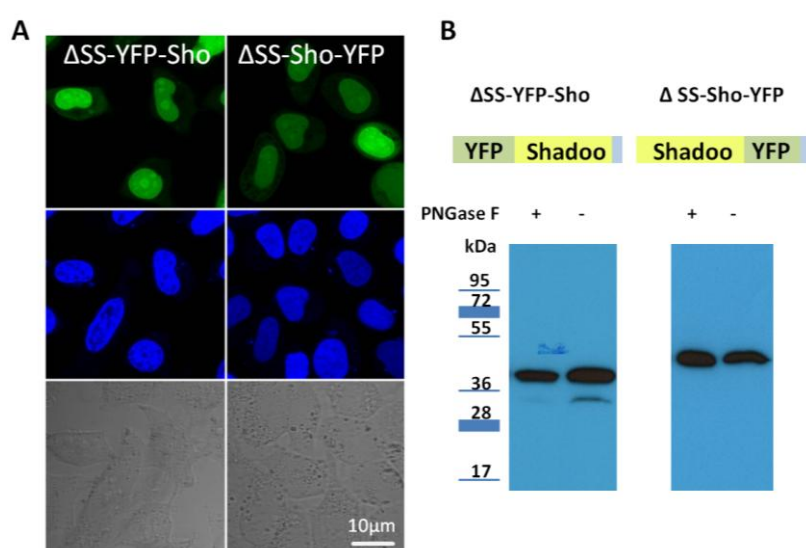


11. ábra A YFP-Sho fúziós fehérje kettős lokalizációja különböző idegi és nem idegi eredetű sejtvonalakban

A reprezentatív képek konfokális lézer pásztázó mikroszkóppal készültek (zöld: YFP). Idegi eredetű sejtvonalak: SH-SY5Y, Zpl2-1, Zw3-5, Hpl3-4, HW13-3; nem idegi eredetű sejtvonalak: K562, HeLa, Cos-7

A: Cos-7 sejtmagi, **B:** Cos-7 nem sejtmagi, **C:** SH-SY5Y sejtmagi, **D:** SH-SY5Y nem sejtmagi, **E:** HeLa sejtmagi, **F:** HeLa nem sejtmagi, **G:** K562 sejtmagi, **H:** K562 nem sejtmagi, **I:** Hpl3-4 sejtmagi, **J:** Hpl3-4 nem sejtmagi, **K:** Zpl2-1 sejtmagi, **L:** Zpl2-1 nem sejtmagi, **M:** HW13-3 sejtmagi, **N:** HW13-3 nem sejtmagi, **O:** ZW3-5 sejtmagi, **P:** ZW3-5 nem sejtmagi lokalizációt mutató sejtek.

Mivel a sejtmagban a sejtmagmembrántól független, diffúz jelet tapasztaltunk, ezért feltételeztük, hogy a fúziós fehérjék először elveszítik membránkötöttségüket, a citoszolba kerülnek, majd onnan jutnak be a sejtmagba. Ezért elkészítettük mindkét orientáció esetében a szekréciós szignál nélküli deléciós mutánt (Δ SS-YFP-Sho, Δ SS-Sho-YFP) annak érdekében, hogy tanulmányozhassuk, mi történik a citoszolba kerülő fúziós fehérjékkel, illetve hogy megvizsgáljuk azt, hogy a YFP helyzete befolyásolja-e a fúziós fehérjék sejtmagba jutását. Az így elkészített konstrukciók sejtszintű lokalizációja megegyezett, mindkét fúziós fehérje kizárólagos sejtmagi dúsulást mutatott (12. ábra). A GPI-horgony szignáljának megléte vagy hiánya nem befolyásolta a sejtmagi dúsulást. Tehát a YFP helyzete nem akadályozza a sejtmagi dúsulást, csak a fúziós fehérjék citoszolba jutását, vagy egy endoproteolitikus hasítás a két konstrukció esetében más-más eredményhez vezet (lásd IV./4. fejezet).



12. ábra A Δ SS-YFP-Sho és a Δ SS-Sho-YFP fúziós fehérjék lokalizációja és Western blot képe

A.) A Δ SS-YFP-Sho és a Δ SS-Sho-YFP lokalizációja HeLa sejtekben. A képek konfokális mikroszkóppal készültek (zöld: YFP, kék: Hoechst 33342 festés, szürke: áteső fényvel készült képek). B.) A Δ SS-YFP-Sho és a Δ SS-Sho-YFP konstrukciók sematikus felépítése, Δ SS: szekréciós szignál szekvencia deléciója, a C-terminális kék téglalap a GPI-horgony szignált jelöli.

Alattuk az emésztetlen (-) és a PNGase emésztett (+) minták Western blot képe látható 12,5%-os SDS-gélén futtatva, majd anti-YFP/GFP antitesttel (1:3500) jelölve.

A YFP-Sho fúziós fehérje citoszolikus és sejtmagi megjelenését elégtelen hatékonyságú ER transzlokáció is okozhatja. ER-retenciós szignált (K D E L aminosavak) tartalmazó YFP-Sho fúziós fehérje (YFP-Sho-KDEL) esetében azonban nem tapasztaltunk sejtmagi lokalizációt, ami azt sugallja, hogy a fehérjék az ER elhagyása után, a szekréciós útvonal egy későbbi pontjáról kerülnek a citoszolba, majd a sejtmagba (további eredmények a IV./5. fejezetben).

2.2 A prion fehérjecsalád kettős sejtszintű lokalizációja

A Shadoo fehérjénél tapasztalt kettős lokalizáció nem egyedülálló a prion fehérjecsaládban. A névadó prion fehérjét már évtizedek óta kutatják és lokalizációjának vizsgálata során leírták, hogy a GPI-horgonyos membrán fehérje bizonyos esetekben megfigyelhető a sejtmagban (lásd I./3.4). Számos kísérlethez használtuk kontrollnak a prion fehérje különböző szekvenciáit és az eredmények szerint a szekréción szignál nélküli GFP fúziós prion fehérje erőteljes sejtmagi dúsulást mutat, azonban a Shadoo fehérjével ellentétben nem figyelhető meg a sejtmagvacskákban. Ez a sejtmagi dúsulás csak nagyon enyhe a prion fehérje N-terminális régióját tartalmazó GFP fúziós konstrukció esetén, annak ellenére, hogy az irodalomban leírt mindkét nukleáris lokalizációs szignált tartalmazza ez a konstrukció. Külön vizsgálva az említett nukleáris lokalizációs szignálokat GFP fúziós konstrukciókkal egyik esetben sem láttunk sejtmagi dúsulást HeLa, N2a és BE(2)-M17 sejtekben. Ennek ellenére a prion fehérje sejtmagi dúsulását (lásd I./3.4) mi is kimutattuk és számos kísérletben használtuk, mint kontroll fehérjét.

A prion fehérjecsalád harmadik tagjának esetében az irodalom nem említ kettős sejtszintű lokalizációt, azonban előzetes eredményeink alapján ez a fehérje is rendelkezik nukleáris lokalizációs szignállal, ugyanis a szekréción szignál szekvencia nélküli YFP fúziós Doppel fehérje (Δ SS-YFP-Dpl) sejtmagi dúsulást mutat (az eredményeket a dolgozatban nem mutatom be). Érdekes tehát, hogy a prion fehérjecsalád mindhárom tagja rendelkezik nukleáris lokalizációs szignállal, annak ellenére, hogy membránfehérjék és a prion fehérjecsalád két tagjánál (prion és Shadoo fehérjék) ez a nukleáris lokalizációs szignál az eddigi eredmények alapján akár fiziológias körülmények között is előidézheti a fehérjék szekréción útvonaltól független előfordulását.

3. A Shadoo fehérje funkcionális nukleáris lokalizációs szignálja

A Shadoo fehérje sejtmagi dúsulásához szükséges egy sejtmagi lokalizációt közvetítő szekvencia, más néven nukleáris lokalizációs szignál. Ezek a szignálok aktív sejtmagi

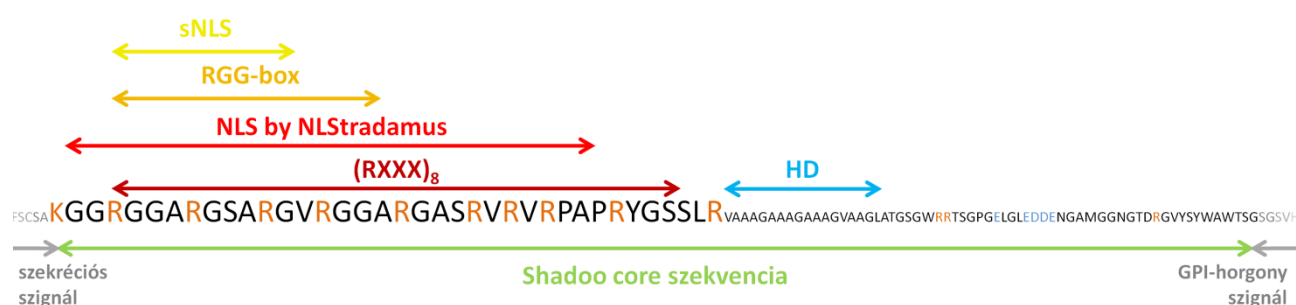
transzportot mediálnak és/vagy valamely sejtmagi komponenshez való kötős révén valósítják meg az adott fehérje sejtmagi dúsulását.

3.1 *In silico* nukleáris lokalizációs szignál predikciók a Shadoo fehérje esetében

A Shadoo fehérje sejtmagi dúsulásáért felelős szekvencia azonosításához először az interneten található nukleáris lokalizációs szignál prediktáló programokkal vizsgáltuk a Shadoo fehérje *core* szekvenciáját. A *PredictNLS* program [109] segítségével azonosítottunk egy rövid szekvenciát az egér Shadoo extrém N-terminálisán a 28. arginintől a 37. glicinig, mint potenciális nukleáris lokalizációs szignált (rövid = *short* NLS, sNLS, 13. ábra). Ez a szekvencia megfelelt az adatbázisban található R G/A X(0-2) G/A R G/A X G/A R G/A konszenzus szekvenciának és a GR-típusú nukleáris lokalizációs szignálokhoz sorolható, mely elsőként a *large Fibroblast Growth Factor* (FGF-) 2 izoformákban írtak le [110]. A *PredictNLS* programon túl az *NLSstradamus* szoftver [111] is azonosított egy lehetséges nukleáris lokalizációs szignált az egér Shadoo N-terminálisán, amely ugyan nagyobb (26. glicintől az 53. alaninig, *NLS by NLSstradamus* 13. ábra), de teljesen magába foglalja a *PredictNLS* által azonosított sNLS szekvenciát.

Vizsgáltuk még a Shadoo lehetséges nukleáris lokalizációs szignálját a *PSORT II* [112] és a *PROSITE* [113] programokkal is, ám ezek nem találtak ilyen szekvenciákat.

Az így talált NLS szekvenciákat kísérletesen vizsgáltuk, az ezzel kapcsolatos eredményeket lásd a IV./3.4-es és IV./3.5-ös fejezetekben.



13. ábra A Shadoo fehérje lehetséges nukleáris lokalizációs szignáljai

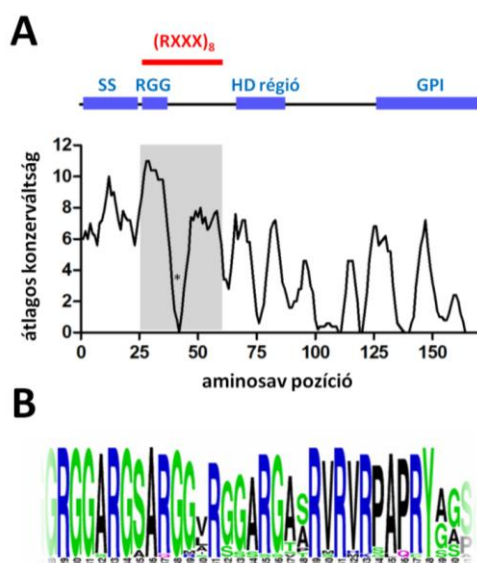
A predikációs programokkal azonosított potenciális nukleáris lokalizációs szignálok (sNLS - sárga, NLS by NLSstradamus – piros) mellett vizsgáltuk a Shadoo fehérje prediktált RGG-boxát (narancssárga) és az egész pozitívan töltött N-terminális (RXXX)₈ motívumot (bordó). Az ábrán feltüntettem a Shadoo fehérje aminosav szekvenciáját, nagyobb betűmérettel kiemelve az N-terminális szakaszt (pozitív aminosavak narancssárgával jelölve). Viszonyításképpen bejelöltem a Shadoo fehérje hidrofób doménjét (HD, kék). A zöld régió a Shadoo fehérje *core* szekvenciáját, míg a szürke régió a szignál szekvenciákat (szekréciós, GPI-horgony) jelöli.

3.2 A Shadoo fehérje prediktált RGG-box motívuma

2008-ban Corley és munkatársai azonosítottak egy pozitívan töltött RGG-box motívumot a Shadoo fehérje N-terminálisán (13. ábra). Az RGG-box motívum egy olyan jellegzetes szekvenciárészlet, amelyről feltételezik, hogy képes RNS-t kötni vagy fehérje - fehérje kölcsönhatásokban részt venni [68]. A Shadoo fehérje esetében még nem bizonyították, hogy ez a szekvencia képes-e nukleinsavak vagy fehérjék kötésére. Azonban, mint lehetséges nukleinsav kötő szekvencia képes lehet előidézni a Shadoo fehérje sejtmagi dúsulását, ezért ezen szekvencia, mint potenciális nukleáris lokalizációs szignál vizsgálata ajánlott.

3.3 A Shadoo fehérje (RXXX)₈ motívuma és bioinformatikai analízise

A Shadoo fehérje N-terminálisának vizsgálata során felfigyeltünk ennek a régióknak a rendezettségére és konzervatív mivoltára (13. ábra, 14. ábra, 15. ábra). Nyolc RXXX *tetrarepeat* található az eddig ismert rágsáló és emberszabású Shadoo szekvenciákban (15. ábra, zöld háttér), és hét az eddig ismert patások Shadoo szekvenciájában, valamint a *Gallus gallus* és a *Xenopus tropicalis* Shadoo szekvenciájában (15. ábra, kék háttér). A 14. ábrán látható, hogy az RGG-box a legkonzervatívabb régió az egész fehérjében, ugyanakkor az N-terminális aminosav összetétele és a pozitív aminosavak elhelyezkedése is jelentős konzerváltságot mutat a gerincesek körében. A Shadoo fehérje további motívumai (szekréción szignál, GPI-horgony szignál, HD régió) mind alacsonyabb konzerváltsági fokot mutatnak, mint az (RXXX)_n motívum (n=7-8) (14. ábra).



14. ábra A Shadoo fehérje és az (RXXX)₈ motívum evolúciós konzerváltsága

A.) Öt aminosavas csúsztatott ablakkal vizsgáltuk az emlős Shadoo fehérje szekvenciájának átlagos konzerváltságát. Az ismert motívumok kékekkel vannak jelölve a diagram felett, az általunk újonnan azonosított (RXXX)_n (n=7-8) motívum pirossal illetve szürke téglalappal van jelölve. Az (RXXX)_n motívum nagyon erősen konzervált a vizsgált emlős Shadoo fehérjék körében. Egyedül a motívumok száma változik hét és nyolc között. Ez az eltérés a diagramon egy rés formájában jelentkezik (*). **B.)** Az (RXXX)_n motívum aminosav szekvenciája, az egyes aminosavak betűmérete összefüggésben van a konzerváltság mértékével. Az ábrán látható, hogy főként a pozitív töltésű aminosavak, de általában az egész régió nagyon erősen konzervált.

Arra is felfigyeltünk, hogy az (RXXX)_n motívum nem csak, hogy egy konzervált régió a Shadoo szekvenciájában, de egyedülálló és karakterisztikus szekvencia a Shadoo fehérjékre nézve. Különböző keresési stratégiákkal sem találtunk más olyan fehérjét, amely hasonló motívummal rendelkezne. Ha viszont az (RXXX)_n motívumot két részre bontottuk és külön vizsgáltuk az RGG-boxot, illetve a maradék szekvenciát, akkor számos fehérjét találtunk, melyekben a Shadoo RGG-boxához hasonló motívummal rendelkeznek, ugyanakkor a maradék pozitívan töltött régió továbbra is egyedülálló maradt a Shadoo fehérjék körében. A Shadoo RGG-boxához hasonló szekvenciát tartalmazó fehérjék mind sejtmagi és/vagy nukleoláris lokalizációjú fehérjék (például: SwissProt ID: P83214, Q6Z1C0, D1Z6B1).

Fajnév	N-terminális szekvencia	No.
Gasterosteus aculeatus	KGG R GG S R GG S RGSH S RSPKAGGY R GGGPHNGGT R GSRY R --GRSSPVR	8
Tetraodon nigroviridis	KGG R GG S R GG S RGSP S RSSTAGSY- R GGAAHG G T R -SR F VAG R ASPVR	8
Takifugu rubripes	KGG R GG S R GG S RGSP S RSSTAGSY- R GGGAHG G T R -SR F VAG R TSPVR	8
Oryzias latipes	KGG R GG S R GG S RGSP S RSSTAGTY- R AGGPVG G T R -SR F VAG R SSPVR	8
Danio rerio	KGG R GG A RG S ARG T ARGG-- R TSR A RG-S-----PA-----VR	6
Pimephales promenales	KGG R GG A RG S ARG S ARGG-- R TSR T RG-S-----PA-----VR	6
Xenopus tropicalis	KGG R GG A RG G ARG A SG R G-----AS R VRL K TSS R YG-----S-LR	7
Gallus gallus	KGG R GG S R GA A RG M ARG-----AA S SRH R GLP R YG-----ALR	7
Monodelphis domestica	KGG R GG A RG A ARG S RSS-----SSSS F MR M K S AP R YS--SSGS A FR	7
Oryx gazella	KGG R GG A RG S ARGG----- R GAA R VRVR P AP R YA---GSSMR	7
Oryx dammah	KGG R GG A RG S ARGG----- R GAA R VRVR P AP R YA---GSSMR	7
Bos taurus	KGG R GG A RG S ARGG----- R GAA R VRVR P AP R YA---GSSMR	7
Bos gaurus	KGG R GG A RG S ARGG----- R GAA R VRVR P AP R YA---GSSMR	7
Bos mutus grunniens	KGG R GG A RG S ARGG----- R GAA R VRVR P AP R YA---GSSMR	7
Kobus megaceros	KGG R GG A RG S ARGG----- R GAA R VRVR P AP R YA---GSSMR	7
Cervus elaphus canadensis	KGG R GG A RG S ARGG----- R GAS R VRVR P AP R YA---GSSMR	7
Cervus elaphus	KGG R GG A RG S ARGG----- R GAS R VRVR P AP R YA---GSSMR	7
Tragelaphus anagassii	KGG R GG A RG S ARGG----- R GAT R VRVR P AP R YA---GSSMR	7
Tragelaphus strepsiceros	KGG R GG A RG S ARGG----- R GAT R VRVR P AP R YA---GSSMR	7
Ovis aries	KGG R GG A RG S ARGG----- R GAA R VRVR P AP R YA---GSSVR	7
Capra hircus	KGG R GG A RG S ARGG----- R GAA R VRVR P AP R YA---GSSVR	7
Canis familiaris	KGG R GG A RG S ARG G L R GGA----- R GAP R VRVR S AP R YG---GSSLN	8
Myotis lucifugus	KGG R GG A RG S ARG G A R GGG----- R GVP R VRVR P AP R YA---GSSLR	8
Oryctogalus cuniculus	KGG R GG A RG S ARG G I R GGA----- R GTS R VRVR P AP R Y---GSSPR	8
Mus musculus	KGG R GG A RG S ARG-V R GGA----- R GAS R VRVR P AP R Y---GSSLR	8
Apodemus sylvaticus	KGG R GG A RG S ARG-V R GGA----- R GAS R VRVR P AP R Y---GSSLR	8
Rattus norvegicus	KGG R GG A RG S ARG-V R GGA----- R GAS R VRVR P AP R Y---SSSLR	8
Cavia porcellus	KGG R GG A RG S ARG G L R SGA----- R GTS R VRVR P AP R YS--AAGSSLR	8
Callithrix jacchus	KGG R GG A RG S ARG G L R GGA----- R GAS R VRVR P AP R YG--APGSSLR	8
Macaca mulatta	KGG R GG A RG S ARG G V R GGA----- R GTS R VRVR P AP R YG--APGSSLR	8
Pongo abelii	KGG R GG A RG S ARG G V R GGA----- R GAS R VRVR P AP R YG--APGSSLR	8
Pan troglodytes	KGG R GG A RG S ARG G V R GGA----- R GAS R VRVR P AQ R YG--APGSSLR	8
Homo sapiens	KGG R GG A RG S ARG G V R GGA----- R GAS R VRVR P AQ R YG--APGSSLR	8

15. ábra Az ismert Shadoo (RXXX)_n szekvenciák összehasonlítása

narancssárga: arginin, rózsaszín: lizin, Az RXXX tetrarepeatek száma a jobb oszlopban van feltüntetve (kék háttér: (RXXX)₇; zöld háttér (RXXX)₈).

Megjegyzés: az egér Shadoo (RXXX)₈ motívuma a 28-58-as aminosavak között található. Eleinte azonban a motívum felismerése előtt az egész N-terminális pozitívan töltött szekvenciát (25-61-es aminosavak) vizsgáltuk. A későbbiekben ellenőriztük, hogy van-e különbség a két szekvencia között sejtmagi dúsulás tekintetében és azt találtuk, hogy mind a 25-61-es aminosavak, mind pedig a 28-58-as aminosavak képesek azonos mértékben előidézni sejtmagi dúsulást. A későbbiekben külön nem tüntettem fel, hogy mikor dolgoztunk csak az (RXXX)₈ motívummal és mikor a 25-61-es szekvenciával.

3.4 A funkcionális nukleáris lokalizációs szignál meghatározása

Egy fehérje funkcionális nukleáris lokalizációs szignáljának azonosítása nem minden esetben egyszerű feladat. Egy adott szekvencia deléciója vagy mutációja megszüntetheti a sejtmagi akkumulációt, azonban ez nem feltétlenül jelenti azt, hogy megtaláltuk a teljes nukleáris lokalizációs szignált. Előfordulhat, hogy az NLS egy részének módosítása már a sejtmagi dúsulás megszűnéséhez vezet, illetve elképzelhető az is, hogy a módosítás a fehérje szerkezetébe, érésébe, vándorlásába (*traffic*) szól bele, vagy egyszerűen csak hozzáférhetetlenné teszi a funkcionális NLS-t. Továbbá gyakori jelenség az is, hogy egy fehérje egynél több nukleáris lokalizációs szignállal rendelkezik. Ilyen esetekben az egyik NLS deléciója nem szünteti meg a sejtmagi dúsulást mindaddig, amíg ezzel egyidejűleg a másik NLS nincs módosítva [114,115].

A deléciós mutánsokat kiegészítve vizsgálni szokták, hogy az adott NLS szekvencia képes-e egy citoszolikus fehérjét a sejtmagba irányítani. Azonban ezen esetekben előfordulhat, hogy a fúziós partner interferál az NLS-sel, illetve az is, hogy képes más fehérjéket a sejtmagba irányítani, ám eredeti kontextusában nem funkcionál, mint NLS. Ez utóbbi NLS típust szokás *cryptic*, azaz rejtett NLS-nek nevezni.

Kísérleteink során mind deléciós, mind fúziós konstrukciókkal is vizsgáltuk a Shadoo fehérje funkcionális NLS szekvenciáját annak érdekében, hogy a fent említett problémákat elkerüljük. Méréseinkhez az irodalomból ismert pozitív kontrollokat használtunk. Az egyik ilyen kontroll, a tiroid transzkripció faktor-1 (ttf1) NLS-e volt, amelyet mindössze deléciós mutánsokkal igazoltak [116,117]. Elkészítettük a GFP-NLS^{ttf1} pozitív kontrollt és azt tapasztaltuk, hogy az NLS-ként azonosított szekvencia nem képes a GFP-t a sejtmagba

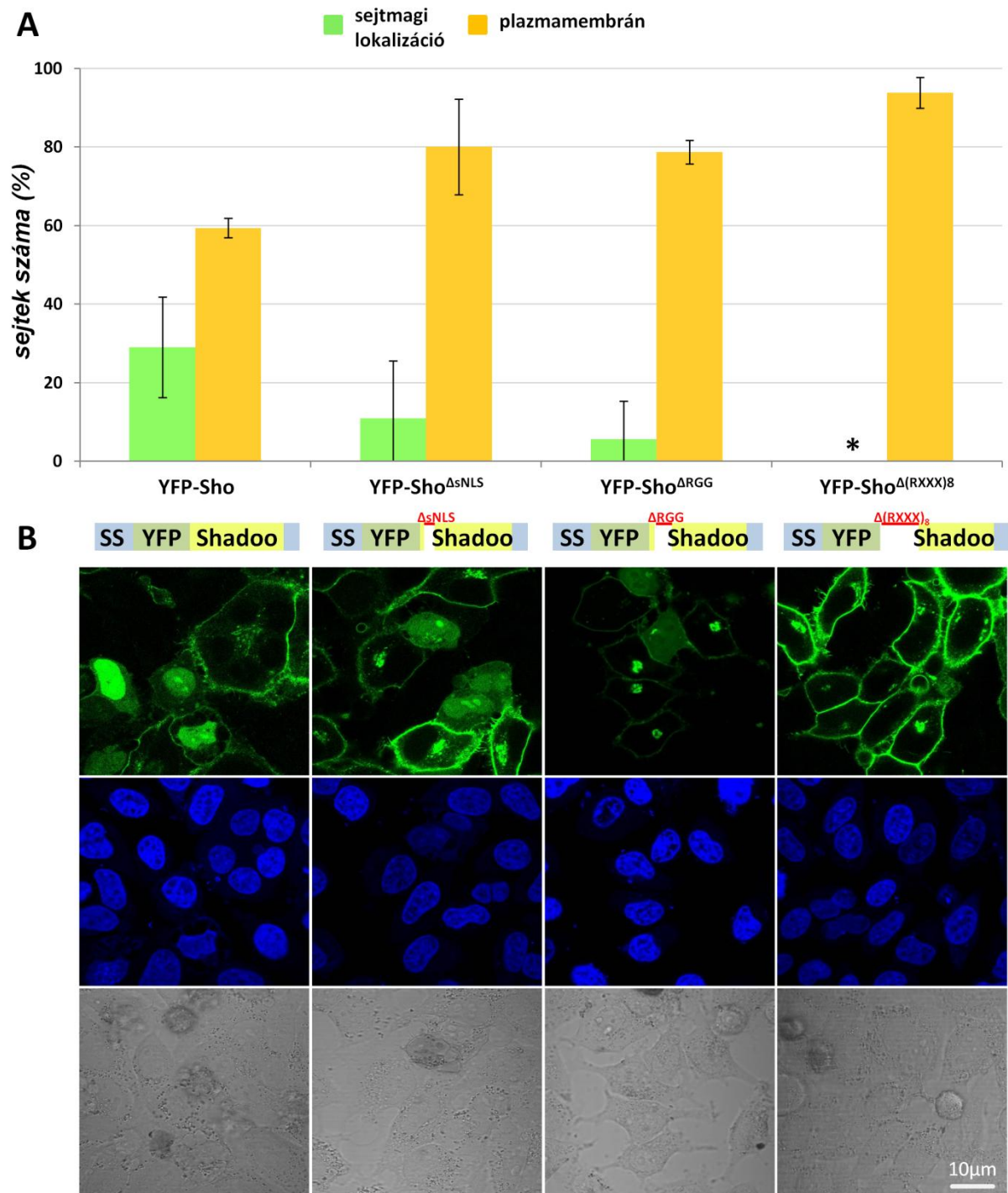
irányítani és ott feldúsítani. Ezért a további kísérletekben a quaking I-5 fehérje (qki5) és az SV40 NLS-ét használtuk pozitív kontrollnak (GFP-NLS^{qki5}, GFP-NLS^{x1SV40}) [95,118,119].

3.4.1 A Shadoo fehérje funkcionális NLS-ének azonosítása deléciós mutánsokkal

A Shadoo fehérje nukleáris lokalizációs szignáljának meghatározásához elkészítettük a prediktált sNLS, a nukleinsavköti RGG-box és a pozitívan töltött (RXXX)₈ motívum deléciós YFP-Sho mutánsokat (YFP-Sho^{ΔsNLS}, YFP-Sho^{ΔRGG}, YFP-Sho^{Δ(RXXX)₈}). Az *NLStradamus* által prediktált NLS-t nem vizsgáltuk, mert szekvenciája majdnem teljesen megegyezik az (RXXX)₈ motívummal (13. ábra). Az elkészített konstrukciókkal HeLa sejteket transzfektáltunk és azt tapasztaltuk, hogy a deléció hosszának növekedésével a sejtmagi lokalizáció fokozatosan csökkent, az (RXXX)₈ motívum deléciójával pedig teljesen megszűntek a sejtmagi dúsulást mutató sejtek (p=0,037, *) (16. ábra).

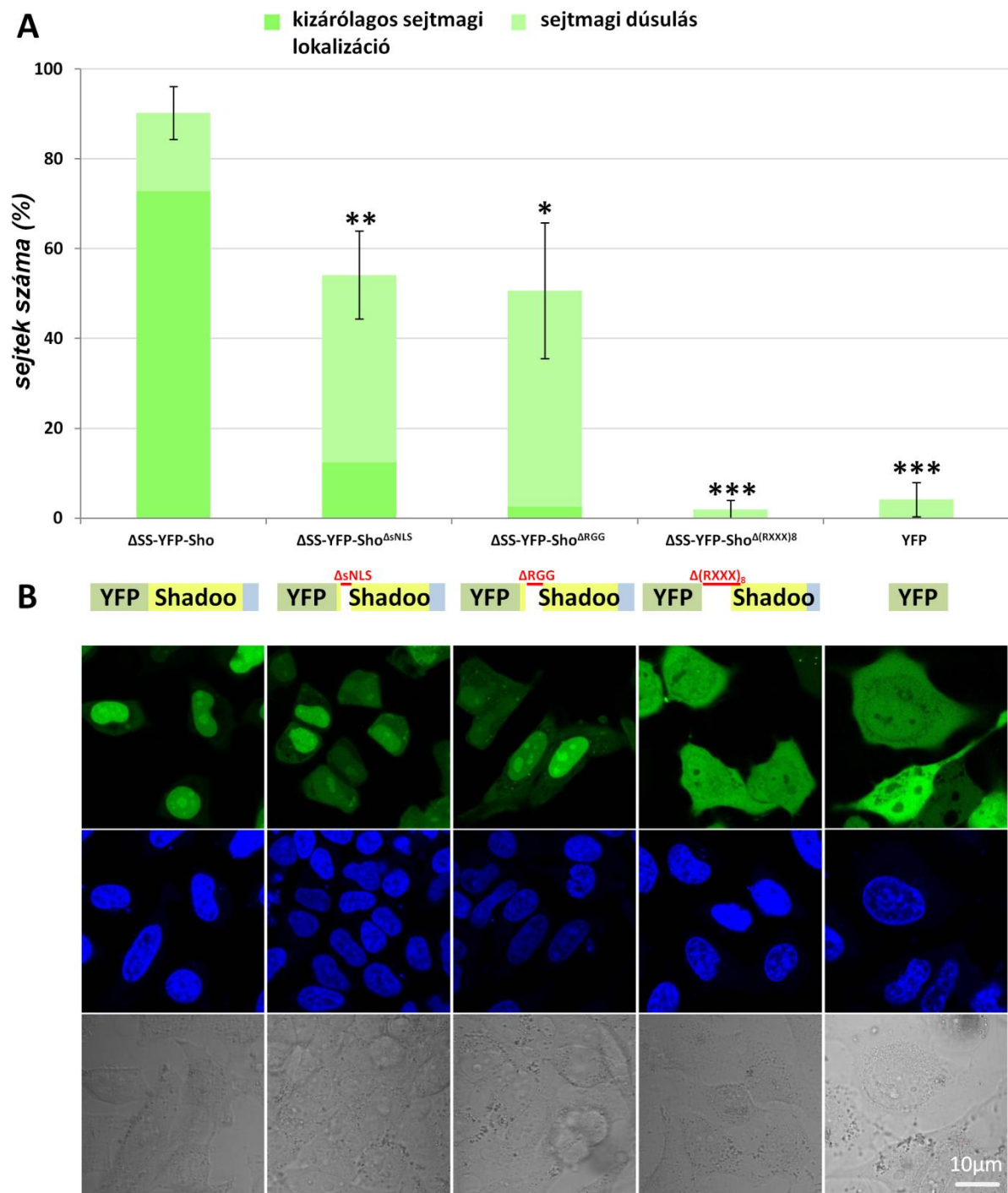
Annak érdekében, hogy az eredményeket könnyebben értelmezhesük elkészítettük ugyanezen szakaszok delécióját a gyakorlatilag csak sejtmagi dúsulást mutató, szekréciós szignál nélküli ΔSS-YFP-Sho fúziós fehérjében is (ΔSS-YFP-Sho^{ΔsNLS}, ΔSS-YFP-Sho^{ΔRGG}, ΔSS-YFP-Sho^{Δ(RXXX)₈}). A deléciók itt is hasonló eredményt mutattak: az sNLS és RGG-box szekvenciák deléciója csökkentette a sejtmagi dúsulást, míg az (RXXX)₈ motívum deléciója teljesen megszüntette a sejtmagi dúsulást, a sejtek a homogén YFP-hez hasonló lokalizációt mutattak (17. ábra).

A ΔSS-YFP-Sho^{ΔsNLS} fúziós fehérje esetében azt tapasztaltuk, hogy a fehérje a sejtek nagyjából felében sejtmagi dúsulást mutatott (17. ábra). Ebből nem következik feltétlenül, hogy az sNLS szekvencia része a Shadoo fehérje NLS-ének, lehetséges, hogy az N-terminális szekvencia második fele felelős a Shadoo fehérje sejtmagi dúsulásáért, az első fele (sNLS vagy RGG-box) pedig egyfajta távtartóként funkcionál, így kiütése megzavarja az NLS felismerését és/vagy működését. A hipotézis ellenőrzésére elkészítettük a ΔSS-Sho-YFP konstrukció esetében is a megfelelő deléciós mutánsokat (ΔSS-Sho^{ΔsNLS}-YFP, ΔSS-Sho^{ΔRGG}-YFP, ΔSS-Sho^{Δ(RXXX)₈}-YFP), hiszen ebben az esetben a deléciók nem változtatják meg a Shadoo fehérje „maradékának” távolságát a YFP-hez képest (18/A ábra). A 18. ábrán látható, hogy az N-terminális második fele (az sNLS vagy az RGG-box hiányában) csökkent mértékben képes a fúziós fehérjét a sejtmagban feldúsítani.



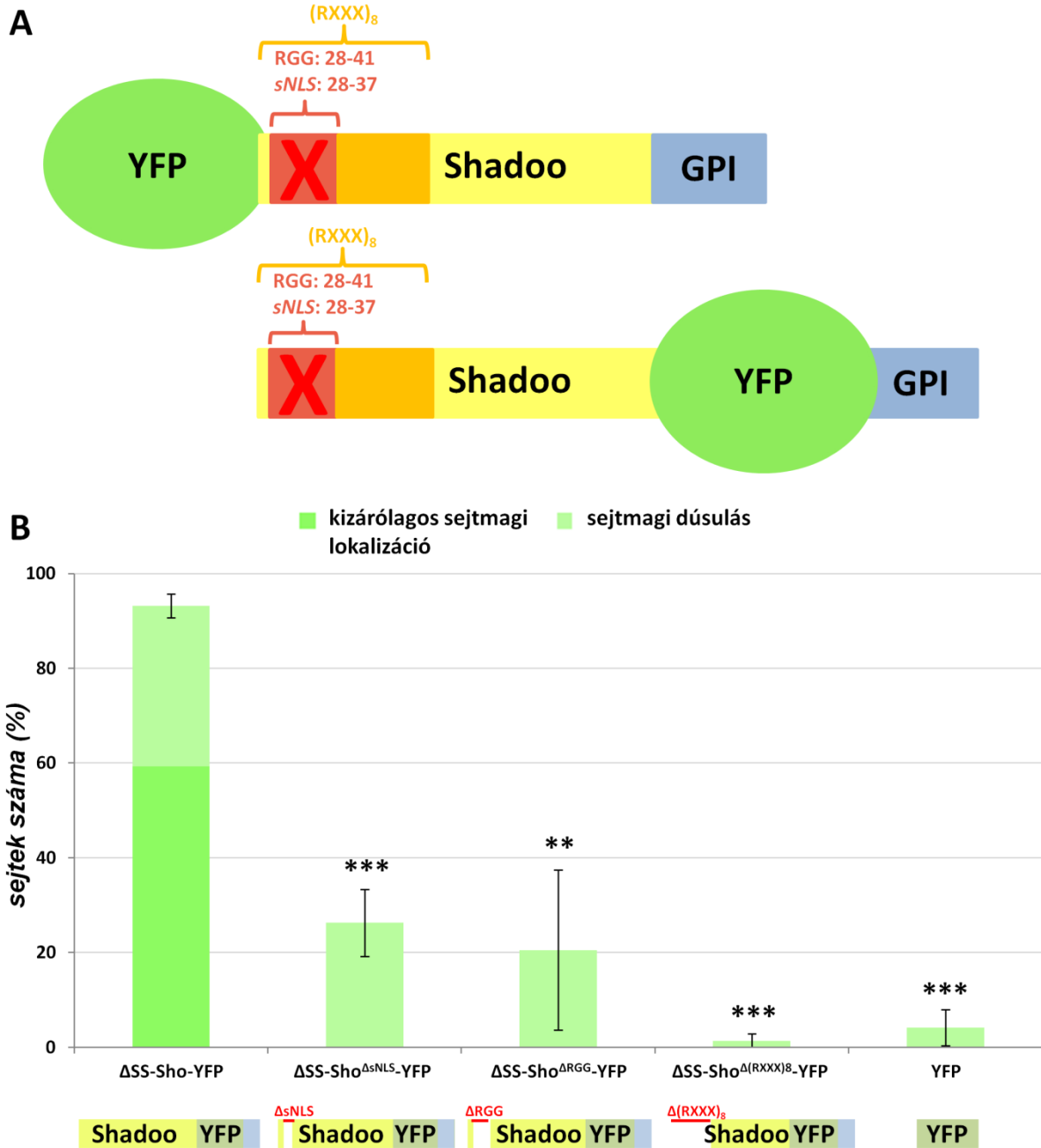
16. ábra YFP-Sho deléciós mutánsok

A.) A YFP-Sho deléciós mutánsok lokalizációja HeLa sejtekben. Minden esetben legalább 100 sejtet számoltunk le és háromszor ismételtük a transzfekciót. * $0,01 < p < 0,05$, a deléciós konstrukciók sejtmagi dúsulását a YFP-Sho esetében számolt eredményhez hasonlítottuk. **B.)** Az egyes fúziós konstrukciók sematikus felépítése (SS: szekréciós szignál, C-terminális kék téglalap: GPI-horgony szignál szekvencia). Alattuk az egyes fúziós fehérjékről készült reprezentatív konfokális mikroszkópos képek láthatóak (zöld: YFP, kék: Hoechst 33342, szürke: áteső fényvel készült képek).



17. ábra ΔSS-YFP-Sho deléciós mutánsok

A.) A ΔSS-YFP-Sho deléciós mutánsok lokalizációja HeLa sejtekben. Minden esetben legalább 100 sejtet számoltunk le és háromszor ismételtük a transzfekciót. * $0,01 < p < 0,05$, ** $0,001 < p < 0,01$, *** $p < 0,001$, a deléciós konstrukciók sejtmagi dúsulását (kizárólagos sejtmagi lokalizáció + sejtmagi dúsulás) a ΔSS-YFP-Sho esetében számolt eredményhez hasonlítottuk. **B.)** Az egyes fúziós konstrukciók sematikus felépítése (ΔSS: szekréciós szignál deléciója, C-terminális kék téglalap: GPI-horgony szignál szekvencia). Alattuk az egyes fúziós fehérjékről készült reprezentatív konfokális mikroszkópos képek láthatóak (zöld: YFP, kék: Hoechst 33342, szürke: áteső fénnel készült képek).



18. ábra ΔSS-Sho-YFP deléciós mutánsok

A.) A deléciók helyzete a ΔSS-YFP-Sho és a ΔSS-Sho-YFP fehérjék esetében. ΔSS-YFP-Sho esetében (felső ábra) az sNLS vagy RGG-box deléciója megváltoztatja a „maradék” szekvencia távolságát a YFP fúziós partnertől, tehát a Shadoo YFP-hez viszonyított relatív helyzete megváltozik és ez befolyásolhatja a funkcionális NLS működését. ΔSS-Sho-YFP esetében (alsó ábra) az N-terminális deléciók nem módosítják a Shadoo és a YFP fúziós partner közötti távolságot. A deléciókat piros x jelöli. A narancssárga régió az N-terminális második felét jelöli. **B.)** A ΔSS-Sho-YFP deléciós mutánsok lokalizációja HeLa sejtekben. Minden esetben legalább 100 sejtet számoltunk le és háromszor ismételtük a transzfekciót. * $0,01 < p < 0,05$, ** $0,001 < p < 0,01$, *** $p < 0,001$, a deléciós konstrukciók sejtmagi dúsulását (kizárólagos sejtmagi lokalizáció + sejtmagi dúsulás) a ΔSS-Sho-YFP esetében számolt eredményhez hasonlítottuk. A diagram alatt az egyes deléciós konstrukciók sematikus képe látható (ΔSS: a szekréciós szignál deléciója, a GPI-horgony szignált a C-terminális kék téglalap jelöli).

A deléciók hatására a Shadoo fehérje sejtmagi dúsulása jelentősen lecsökkent annak ellenére, hogy a YFP-hez viszonyított helyzete és távolsága nem változott (18. ábra). Tehát az N-terminális első felének funkciója nem pusztán a távolság biztosítása volt a Δ SS-YFP-Sho fúziós fehérjében, ez a szekvencia is hozzájárul a Shadoo fehérje sejtmagi dúsulásához.

Ezek az eredmények arra engednek következtetni, hogy a Shadoo sejtmagi akkumulációjáért felelős szekvencia az N-terminális (RXXX)₈ motívum vagy ennek egy része.

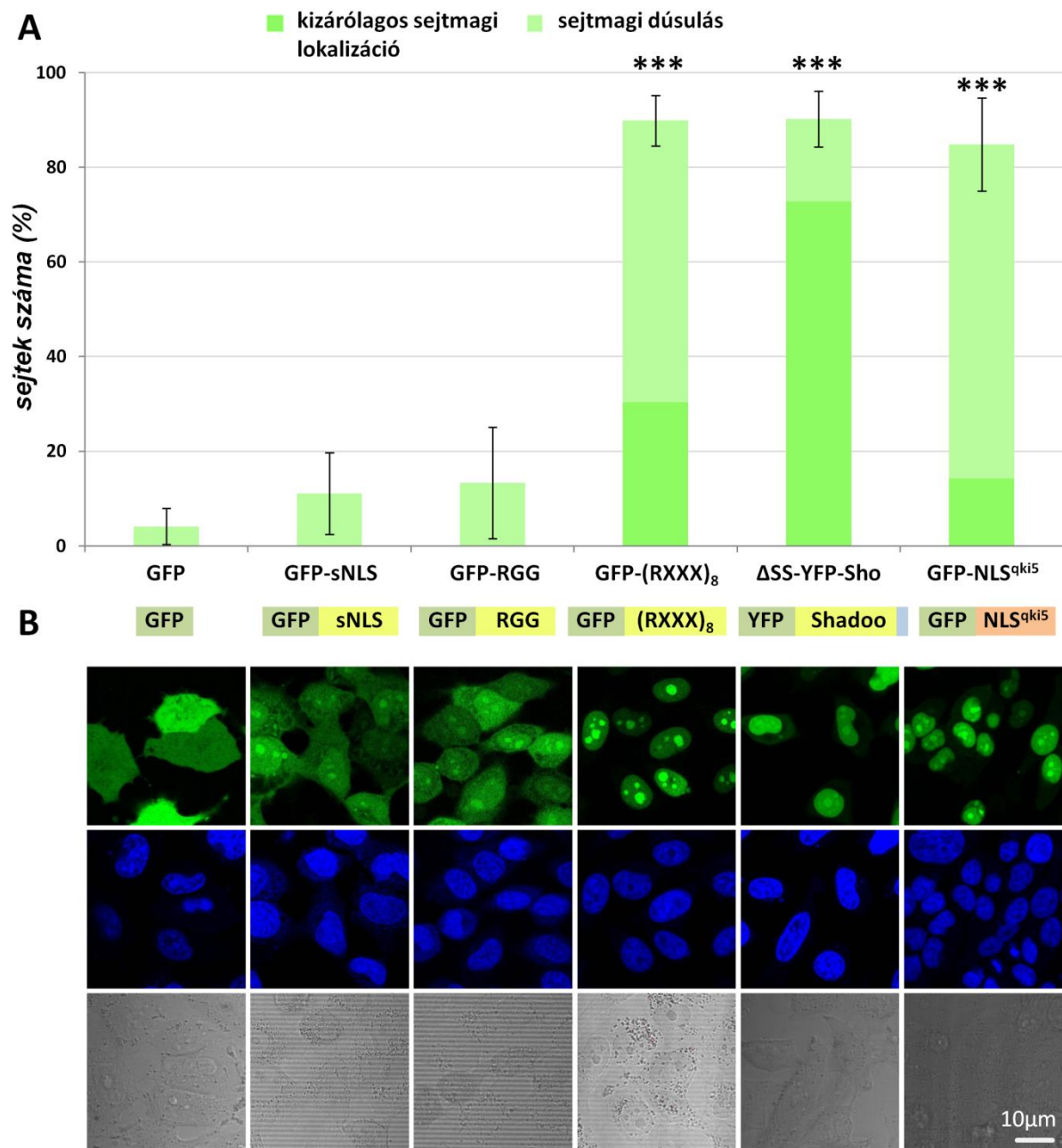
3.4.2 A Shadoo fehérje funkcionális NLS-ének azonosítása fúziós fehérjékkel

Hogy eldönthessük melyik szekvencia a Shadoo fehérje funkcionális NLS-e, megnéztük, hogy az előző fejezetben vizsgált szakaszok közül melyik képes egy citoszolikus fehérjét a sejtmagba irányítani és ott feldúsítani. Elkészítettük a GFP C-terminálisára illesztett potenciális NLS konstrukciókat (GFP-sNLS, GFP-RGG és GFP-(RXXX)₈) és vizsgáltuk a fúziós fehérjék sejtszintű lokalizációját HeLa sejtekben. A GFP-sNLS, GFP-RGG fúziós fehérjék lokalizációja megközelítőleg megegyezett a negatív kontrollként használt GFP lokalizációjával. Elképzelhető, hogy a GFP interferált az sNLS, illetve RGG-box szekvenciákkal és ezért nem láttunk sejtmagi dúsulást, ám az (RXXX)₈ motívum esetében, amely ugyanolyan linker szekvenciával kapcsolódik a GFP C-terminálisához, mint a másik két vizsgált potenciális NLS szekvencia, megközelítőleg minden sejtmagi akkumulációt tapasztaltunk (19. ábra).

Mindezek alapján arra a következtetésre jutottunk, hogy az sNLS és RGG-box szekvenciák önmagukban nem képesek a fúziós fehérjéket a sejtmagba irányítani, viszont részei a Shadoo funkcionális nukleáris lokalizációs szignáljának, amely az N-terminális (RXXX)₈ motívum része vagy egésze.

3.5 Az (RXXX)₈ motívum funkcionális jellemzése

A Shadoo NLS-eként azonosított (RXXX)₈ motívum megfeleltethető a karioferin β 2 karrier fehérje által felismert konszenzus szekvenciának. A karioferin β 2 olyan nagyjából 30 aminosav hosszúságú rendezetlen szekvenciákat ismer fel, melyek összességében pozitív töltésűek vagy hidrofóbok és R/K/H X(2-5) PY szekvenciára végződnek [96].

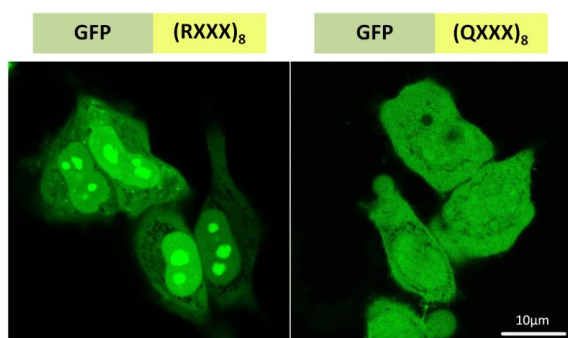


19. ábra A GFP-fúziós potenciális Shadoo nukleáris lokalizációs szignálok lokalizációja

A.) A GFP-NLS fúziós fehérjék lokalizációja HeLa sejtekben. Minden esetben legalább 100 sejtet számoltunk le és háromszor ismételtük a transzfekciót. * $0,01 < p < 0,05$, ** $0,001 < p < 0,01$, *** $p < 0,001$, a deléciós konstrukciók sejtmagi dúsulását (kizárólagos sejtmagi lokalizáció + sejtmagi dúsulás) a GFP esetben számolt eredményhez hasonlítottuk. **B.)** Az egyes fúziós konstrukciók sematikus felépítése (a GPI-horgonyt a C-terminális kék téglalap jelöli, *qki5*: quaking I-5 fehérje). Alattuk az egyes fúziós fehérjékről készült reprezentatív konfokális mikroszkópos képek láthatóak (zöld: GFP/YFP, kék: Hoechst 33342, szürke: áteső fényen készült képek).

A Shadoo fehérje esetében a pozitív töltésű nagyjából 30 aminosavas N-terminális szekvenciát az R P A P R Y aminosav szekvencia határolja, mely majdnem tökéletesen megfelel a konszenzus szekvenciának. A határoló konszenzus szekvencia nagyon érzékeny a különböző mutációkra, így a Shadoo (YFP-Sho Δ SS-YFP-Sho, GFP-(RXXX)₈) esetében ezt a szekvenciát módosítottuk (52-56-os aminosavak cseréje alaninokra), és vizsgáltuk a mutáció magi dúsulásra gyakorolt hatását. Egyik módosított konstrukció (YFP-Sho^{52-56A} Δ SS-YFP-Sho^{52-56A}, GFP-(RXXX)₈^{52-56A}) esetében sem tapasztaltunk változást sejtmagi dúsulásban (az eredményeket a dolgozatban nem mutatom be).

A Shadoo fehérje extrém N-terminálisán található (RXXX)₈ motívum speciális, ilyen formában csak a Shadoo fehérjékre jellemző motívum, bár nagy vonalakban hasonlít több nukleinsav kötő motívumhoz (arginin-gazdag motívum, RGG box, RXXR motívum). Az argininek pozíciója szabályszerűséget mutat, két arginin között általában három kis méretű aminosav (például: glicin, alanin, valin) tartja a távolságot. Az eddig ismert Shadoo szekvenciák összehasonlításával felfigyeltünk arra, hogy ez a motívum különösen konzervált a gerincesek körében (14. ábra). Az argininek pozíciójának ilyen fokú szabályossága és konzerváltsága különösen érdekessé teszi ezt a motívumot. Az argininek szerepét vizsgáltuk a Shadoo fehérje sejtmagi dúsulásával kapcsolatban. Az argininek glutaminra történő cseréje a teljes magi dúsulást megszüntette a GFP fúziós fehérje esetében (GFP-(QXXX)₈) (20. ábra).



20. ábra A rendezett argininek szerepe a Shadoo sejtmagi lokalizációjában

A GFP-(RXXX)₈ és GFP-(QXXX)₈ fúziós fehérjék sematikus felépítése és lokalizációja HeLa sejtekben. Az argininek glutaminra történő cseréje teljesen megszüntette a GFP fúziós fehérje sejtmagi dúsulását. A reprezentatív képek konfokális mikroszkóppal készültek (zöld: GFP).

3.5.1 Az (RXXX)₈ motívum által közvetített magtranszport jellemzése

A következőkben jellemeztük az azonosított NLS által mediált sejtmagi transzportot (aktív folyamat vagy passzív diffúzió), illetve vizsgálni kívántuk, hogy a Shadoo fehérje rendelkezik-e valamilyen sejtmagi kötőpartnerrel.

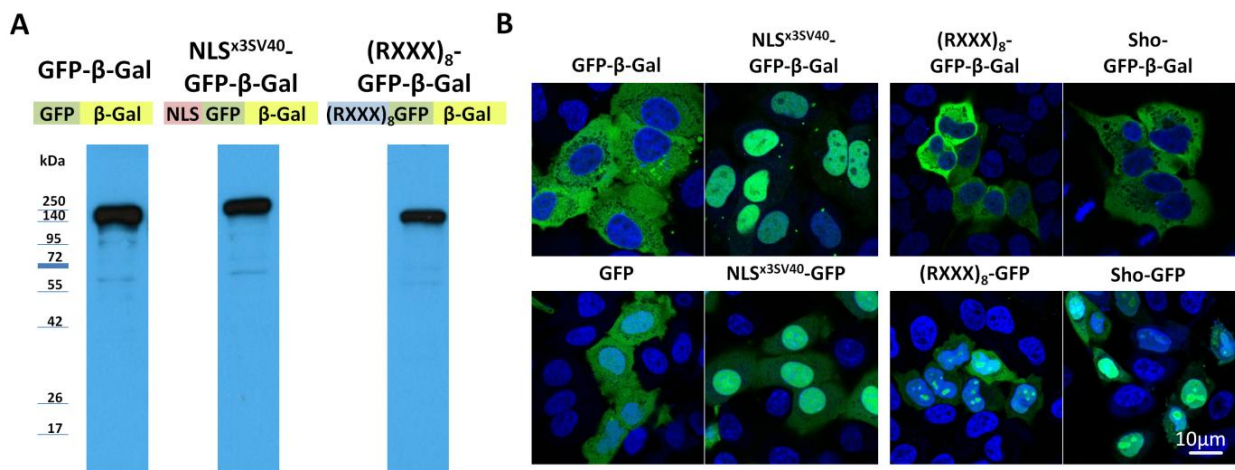
A sejtmag pórus komplex kisméretű fehérjék (<60 kDa) számára szabadon átjárható (diffúzió), majd ezek a fehérjék egy sejtmagi kötőpartnerhez rögzülve képesek dúsulni a sejtmagban (passzív transzport). A kötésben részt vevő szekvenciát nukleáris retenció szignálnak is nevezik. Ezzel szemben számos fehérje energiafüggő folyamat révén, úgynevezett aktív transzporttal kerül a sejtmagba, amelyet többnyire az importin család különböző karrier fehérjéi bonyolítanak le. Egyes kis fehérjék aktív és passzív transzporttal párhuzamosan is bekerülhetnek a sejtmagba, így előfordulhat az, hogy egy aktív transzportot közvetítő nukleáris lokalizációs szignál elfed egy passzív transzportot mediáló nukleáris retenció szignált és *vica versa*. Mivel a Shadoo fehérje elég kisméretű a passzív transzporthoz, meg kell vizsgálni mindkét lehetséges folyamatot. Ennek érdekében két irányból közelítettük meg ezt a kérdést. Egyrészt vizsgáltuk a sejtmag pórus komplexen történő átjutást (aktív és/vagy passzív folyamat), másrészt vizsgáltuk a lehetséges sejtmagi kötőpartner(ek) meglétét. Minden kísérletben külön vizsgáltuk a teljes Shadoo fehérjét és az (RXXX)₈ motívumot, továbbá a prion fehérjét és annak N-terminális rendezetlen szekvenciáját összehasonlítóképpen.

3.5.1.1 A sejtmag pórus komplexen történő átjutás jellemzése

Annak érdekében, hogy eldöntsük, képes-e az (RXXX)₈ motívum aktív transzportot mediálni, megnöveltük a fúziós fehérjék méretét további fúziós partnerekkel, hogy kizárjuk a fehérjék diffúzióval történő sejtmagba jutását. Két különböző fúziós partnert alkalmaztunk, azért hogy csökkentsük annak az esélyét, hogy a fúziós partner és a vizsgált szekvencia között interferencia lép fel. Készítettünk tehát GFP- β -galaktozidáz fúziós konstrukciókat és GFP-(Cherry)₄ fúziós konstrukciókat is. A fúziós konstrukciók orientációját is változtattuk, a GFP- β -galaktozidáz a vizsgált szekvencia C-terminálisára volt illesztve, míg a GFP-(Cherry)₄ a vizsgált szekvenciák N-terminálisára. Pozitív kontrollként az ismert, aktív transzportot közvetítő SV40 NLS-t használtuk. A Shadoo mellett vizsgáltuk a prion fehérje magtranszportját is.

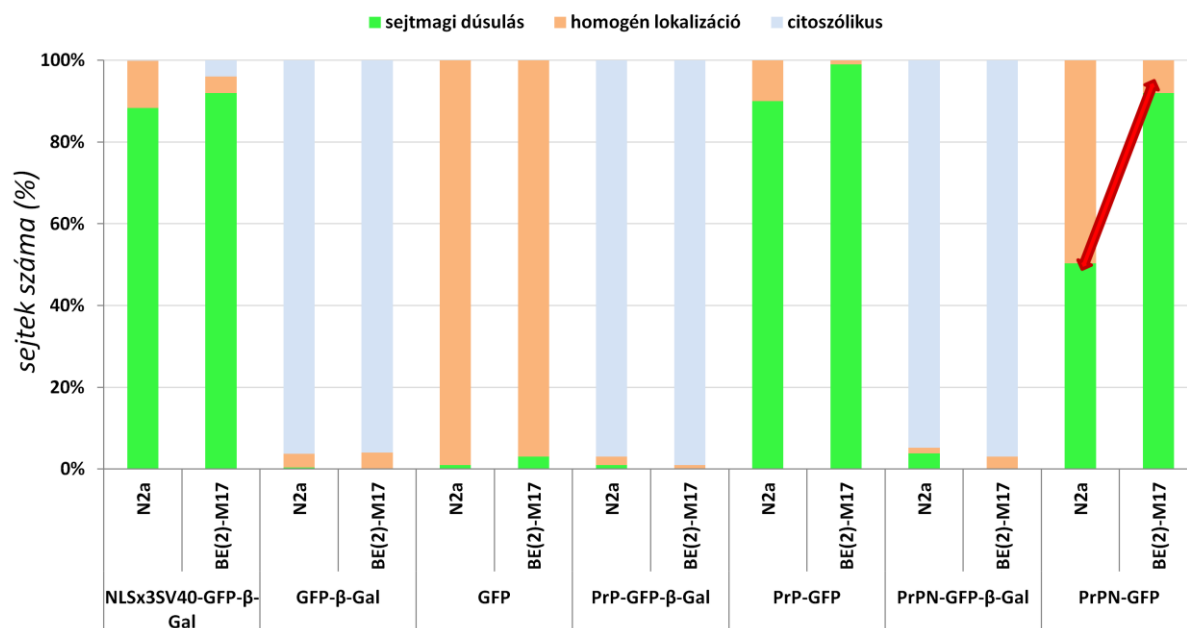
- i.) GFP- β -galaktozidáz fúziós fehérjék lokalizációja: A vizsgálni kívánt szekvenciák (Shadoo és prion fehérje *core* szekvencia, (RXXX)₈ motívum, prion fehérje N-terminális) C-terminálisához illesztettük a fúziós partnert. Minden GFP- β -galaktozidáz fúziós fehérjéhez elkészítettük a β -galaktozidáz nélküli konstrukciót is, hogy megmutassuk, a vizsgált szekvenciák képesek-e sejtmagi dúsulást előidézni az adott

orientációban. A 21. ábrán látható, hogy a kontroll GFP méretét megnövelve a β -galaktozidáz fúziós partnerrel a fúziós fehérje (GFP- β -Gal) kizáródik a sejtmagból. Ezt a nagyméretű fúziós fehérjét azonban az SV40 aktív transzportot közvetítő nukleáris lokalizációs szignálja képes feldúsítani a sejtmagban (NLS^{x3SV40}-GFP- β -Gal). A Shadoo N-terminális pozitívan töltött régióját [(RXXX)₈-GFP- β -Gal], illetve a teljes Shadoo fehérjét [Sho-GFP- β -Gal] vizsgálva azonban nem tapasztaltunk sejtmagi dúsulást annak ellenére, hogy a β -galaktozidáz nélküli fúziós fehérjék az adott összeállításban sejtmagi dúsulást mutattak (21. ábra). Ugyanezen kísérleteket elvégezve a teljes prion fehérje és a prion fehérje N-terminálisát (23-114. aminosavak) tartalmazó fúziós fehérjéken hasonló eredményre jutottunk. További érdekesség, hogy a prion fehérje N-terminálisánál HeLa, Cos-7 és N2a sejtekben sem tapasztaltunk kifejezett sejtmagi dúsulást (22. ábra, N2a sejteken kapott eredmények), ezért áttértünk a BE(2)-M17 humán neuroblasztóma sejtvonal használatára, melyben már sikeresen megmutatták a prion fehérje N-terminálisának dúsulását a sejtmagban [29]. Az eredményekből jól látható, hogy az elkészített PrP-GFP- β -Gal és PrP^N-GFP- β -Gal fúziós fehérjék kizáródnak a sejtmagból, csak citoszolikus lokalizációt kaptunk. A kontroll, β -galaktozidáz nélküli fúziós fehérjék megfelelően működtek (22. ábra).



21. ábra A különböző Shadoo fragmentek GFP- β -galaktozidáz fúziós konstrukcióinak sematikus felépítése, Western blot képe és lokalizációja

A.) A GFP- β -gal, az NLS^{x3SV40}-GFP- β -gal és az (RXXX)₈-GFP- β -gal fúziós fehérjék sematikus felépítése és Western blot képe (10% SDS-PAGE, anti-GFP/YFP antitest 1:3500). Az SV40 NLS-ét bordó háttérrel jelöltük. **B.)** A GFP- β -gal, az NLS^{x3SV40}-GFP- β -gal, az (RXXX)₈-GFP- β -gal, a Sho-GFP- β -gal (felső sor), a GFP, az NLS^{x3SV40}-GFP, az (RXXX)₈-GFP és a Sho-GFP sejtszintű lokalizációja. A bemutatott reprezentatív képek konfokális mikroszkóppal készültek (kék: Hoechst 33342, zöld: GFP). β -Gal = β -galaktozidáz, SV40 NLS = Simian Vacuolating Virus 40 nukleáris lokalizációs szignál.

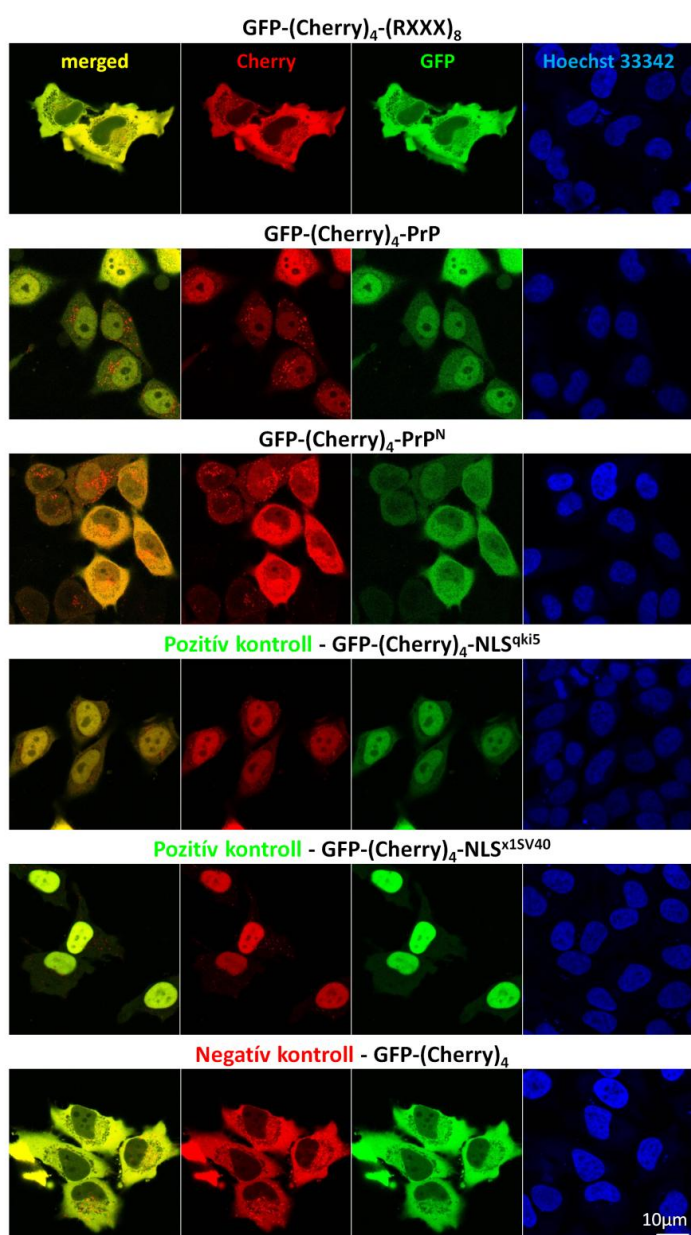


22. ábra A különböző prion fehérje fragmens GFP-β-galaktózidáz fúziós fehérjék lokalizációjának összehasonlítása N2a és BE(2)-M17 sejtekben

A lokalizációt az alábbi szempontok alapján számoltuk: sejtmagi dúsulás - a fúziós fehérje intenzitása magasabb a sejtmagban, mint a citoszolban; homogén lokalizáció - a fúziós fehérje intenzitása megegyezik a sejtmagban és a citoszolban; citoszólus - a fúziós fehérje csak a citoszolban figyelhető meg, a sejtmagból kizáródik. N2a sejtek esetében a kísérleteket háromszor ismételtük és minden esetben legalább 100 sejtet számoltunk le. BE(2)-M17 sejtek esetében is háromszor ismételtük a kísérleteket, de csak két esetben számoltunk le a lokalizációt 100 sejten. Az eredmények alapján látható, hogy prion fehérje N-terminálisának lokalizációja eltérő képet adott N2a és BE(2)-M17 sejtekben, N2a sejtekben a kapott ~50%-os sejtmagi dúsulás is nagyon gyenge a BE(2)-M17 sejtekben tapasztaltakhoz képest (piros nyíl). Más esetekben nem tapasztaltunk szignifikáns eltérést a két sejtvonal között. β-Gal = β-galaktózidáz, SV40 NLS = Simian Vacuolating Virus 40 nukleáris lokalizációs szignál.

- ii.) GFP-(Cherry)₄ fúziós fehérjék lokalizációja: Hasonlóan a β-galaktózidáz fúziós kísérletekhez, elkészítettük a megfelelő fúziós konstrukciókat, csak ellentétes orientációban. Tehát a fúziós partnerz a vizsgált szekvencia N-terminálisára illesztettük. Ennek megfelelően a kontroll, csak-GFP-s konstrukciók is elkészültek az ellentétes orientációban. A konstrukciókat transzfektálva HeLa sejtekbe, a Shadoo fehérje esetében hasonló eredményeket kaptunk, mint a GFP-β-galaktózidázos fúziós fehérjék esetében, tehát nem tapasztaltunk sejtmagi dúsulást a GFP-(Cherry)₄-(RXXX)₈ fúziós fehérje esetében. Az eddigi kísérletekben használt quaking I-5 fehérje NLS-ét ebben a rendszerben is megvizsgáltuk, annak ellenére, hogy nincs irodalmi adat arra, hogy ez a nukleáris lokalizációs szignál képes-e aktív transzportot

közvetíteni. A 23. ábrán látható, hogy a GFP-(Cherry)₄-NLS^{qki5} fúziós fehérje sejtmagi dúsulást mutatott, tehát a quaking I-5 fehérje NLS-e a nagy fúziós fehérjét a sejtmagba irányította. A további kontroll konstrukciók a vártak megfelelően működtek (23. ábra). A prion fehérje esetében viszont ellentétes eredményt kaptunk a GFP-β-galaktozidáz rendszerben kapott eredményekhez hasonlítva. A GFP-(Cherry)₄-PrP fúziós fehérje majdnem minden sejtben enyhe vagy kifejezett sejtmagi dúsulást mutatott. Az N-terminális régiót vizsgálva ez a dúsulás nem kifejezett, viszonylag kevés (~5%) sejtben tapasztaltunk sejtmagi dúsulást, ám a sejtek közel felében a citoszolikus és sejtmagi jelintenzitás nagyjából megegyezett és csak a maradék ~40% esetében láttunk csak citoszolikus lokalizációt.



23. ábra A különböző GFP-(Cherry)₄ fúziós fehérjék lokalizációja HeLa sejtekben

A GFP-(Cherry)₄-(25-61)^{sho}, a GFP-(Cherry)₄-PrP, a GFP-(Cherry)₄-PrP^N, a GFP-(Cherry)₄-NLS^{qki5}, a GFP-(Cherry)₄-NLS^{SV40} és a GFP-(Cherry)₄ fúziós fehérjék lokalizációja HeLa sejtekben. A reprezentatív képek konfokális lézer pásztázó mikroszkóppal készültek (piros: Cherry, zöld: GFP, kék: Hoechst 33342, sárga (merged): Cherry és GFP felvétel összeillesztve).

A GFP- β -galaktozidázos és GFP-(Cherry)₄ eredményeket összevetve a Shadoo fehérje esetében arra a következtetésre jutottunk, hogy a Shadoo fehérje nukleáris lokalizációs szignálja feltehetően nem közvetít aktív transzportot. A prion fehérje esetében ellentétes eredményeket kaptunk, a GFP- β -galaktozidáz rendszerben nem tapasztaltunk sejtmagi dúsulást, míg a GFP-(Cherry)₄ rendszerben igen. A GFP- β -galaktozidáz rendszerben kapott negatív eredmény feltehetően valamilyen interferencia eredménye a prion fehérje és a β -galaktozidáz fúziós partner között. Az továbbra is kérdéses, hogy a prion fehérje mely régiója tartalmazza a nukleáris lokalizációért felelős szekvenciákat, az azonban feltételezhető, hogy ezen szekvenciák aktív transzporttal juttatják be a sejtmagba a fehérjét.

3.5.1.2 Nukleáris retenció szignál felderítése a Shadoo és prion fehérjéknél

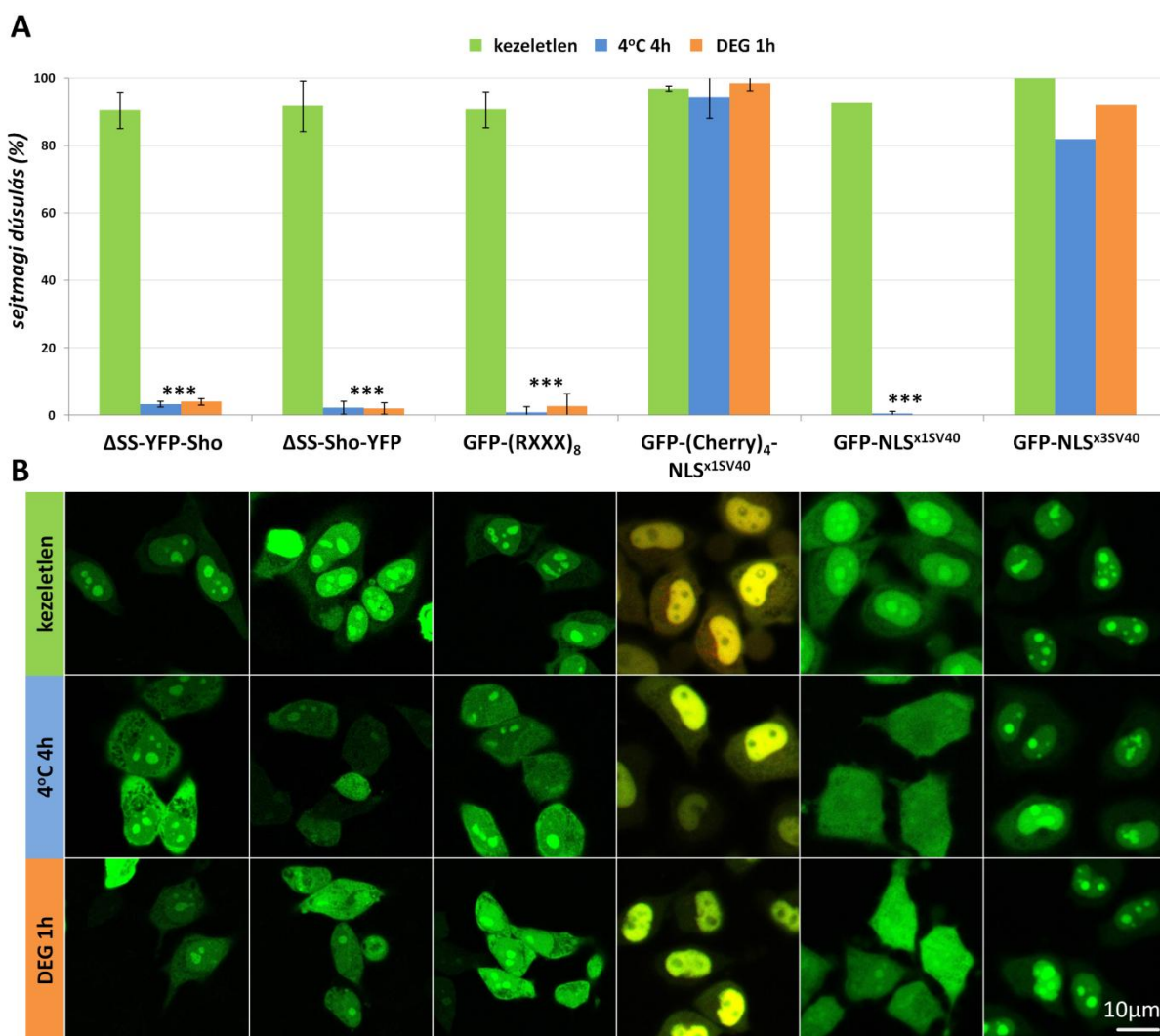
Ha a Shadoo fehérje sejtmagba lépése passzív folyamat, egy kötőpartner szükséges a sejtmagi dúsulásához, amit az aktív folyamatok blokkolásával (4°C-ra hűtés, dezoxi-glükóz kezelés [103]) vizsgáltunk. A prion fehérje esetében pedig az aktív transzport mellett nem lehetséges a potenciális sejtmagi kötőpartner vizsgálata, így itt is indokolt az aktív folyamatok blokkolása és a lehetséges kötőpartner felderítése. Az aktív folyamatok blokkolásával azok a sejtmagi fehérjék, amelyeknek nincsen sejtmagi kötőpartnerük és csak az aktív transzportfolyamatok révén dúsultak a sejtmagban, ki fognak egyenlítődni (equilibrálni) a sejtmag és a citoszol között, tehát homogén lokalizációt mutatnak a kezeléseket követően. Míg azok a fehérjék, melyek a sejtmagban valamilyen kötőpartnerhez (pl: nukleinsavak, sejtmag rezidens fehérjék) kapcsolódnak, az aktív transzportot gátló kezeléseket követően továbbra is sejtmagi dúsulást fognak mutatni függetlenül attól, hogy aktív vagy passzív folyamat révén kerültek be a sejtmagba.

Ezen kísérletekben vizsgáltuk a teljes Shadoo szekvenciáját YFP-fúziós konstrukcióban mindkét orientációban (Δ SS-YFP-Sho, Δ SS-Sho-YFP), az N-terminális pozitívan töltött régiót önmagában is (GFP-(RXXX)₈), a teljes prion fehérjét (PrP-GFP) és annak N-terminálisát is (PrP^N-GFP). Pozitív és negatív kontrollunk az SV40 nukleáris lokalizációs szignálja volt GFP fúziós konstrukcióban (GFP-NLS^{x1SV40}). Míg az egy darab SV40 NLS tartalmazó fúziós fehérjének láthatóan nem volt sejtmagi kötőpartnere, addig a három tandem SV40 NLS-t tartalmazó fúziós konstrukció kötődött valamilyen sejtmagi komponenshez (GFP-NLS^{x3SV40}). A kísérletek során monitoroztuk a sejtmagmembrán intaktaságát is egy nagyméretű, sejtmagban lokalizálódó, sejtmagi kötőpartnerrel nem

rendelkező konstrukcióval (GFP-(Cherry)₄-NLS^{x1SV40}). Ez a konstrukció méreténél fogva túl nagy ahhoz, hogy kijusson a sejtmagból, ám a pórusok sérülésével – lévén nem rendelkezik kötőpartnerrel – visszakerülhet a citoszolba.

4 órán keresztül 4°C-on tartottuk a transzfektált HeLa sejteket, majd konfokális lézer pásztázó mikroszkóppal értékeltük a sejtszintű lokalizációt. A GFP-(Cherry)₄-NLS^{x1SV40} fúziós fehérje lokalizációja a kezelés során változatlan maradt, tehát a sejtmagmembrán pórusai intaktak maradtak, az esetleges lokalizációban bekövetkező változások nem magyarázhatóak a nukleáris póruskomplexek szétesésével. Ezzel szemben a GFP-NLS^{x1SV40} fúziós fehérje sejtmagi dúsulása megszűnt, a vártnak megfelelő homogén, GFP-hez hasonló lokalizációt kaptunk. Ehhez hasonlóan mindhárom vizsgált Shadoo-s konstrukció (Δ SS-YFP-Sho, Δ SS-Sho-YFP, GFP-(RXXX)₈) esetében azt tapasztaltuk, hogy a sejtmagi dúsulás megszűnt, de a nukleoluszokban továbbra is dúsul a fúziós fehérje (24. ábra – kék oszlopok). Mindezek alapján feltételezhető, hogy a Shadoo fehérje, illetve az (RXXX)₈ motívum rendelkezik valamilyen kötőpartnerrel a sejtmagvacskában. Ezen eredményeket alátámasztják a deoxy-glükózzal végzett kísérletek (24. ábra – narancssárga oszlopok).

Összefoglalva azt találtuk, hogy bár a Shadoo fehérje magba jutása passzív folyamat, magi dúsulása és/vagy egy sejtmagi kötőpartnerhez való kötődése viszont aktív folyamatfüggő, hiszen az aktív folyamatok blokkolásával megszűnt a sejtmagi dúsulása. Elképzelhető, hogy a fehérje önmagában diffúzióval jut a sejtmagba, de ott egy olyan komponenshez kötődik, melynek sejtmagi lokalizációja aktív folyamatokat igényel. Az aktív folyamatok egyöntetű blokkolásával ennek a hipotetikus kötőpartnernek a lokalizációja megváltozik, equilibrálni fog a sejtmag és a citoszol között, melyet a Shadoo fehérje követ. Ezt a feltételezést megpróbáltuk alátámasztani bizonyos aktív folyamatok specifikus blokkolásával (RNS szintézis – aktinomicin D, fehérje szintézis – cikloheximid, foszforiláció/defoszforiláció – staurosporin), ám egyik vizsgált folyamat esetében sem tapasztaltuk, hogy befolyásolná a Shadoo fehérje és feltételezett kötőpartnerének sejtmagi lokalizációját. Ennek a hipotézisnek az alátámasztása egyelőre folyamatban van, további olyan aktív folyamatokat szeretnénk blokkolni, melyek kapcsolatba hozhatóak a Shadoo fehérje sejtmagi dúsulásával (pl: metiláció, demetiláció).

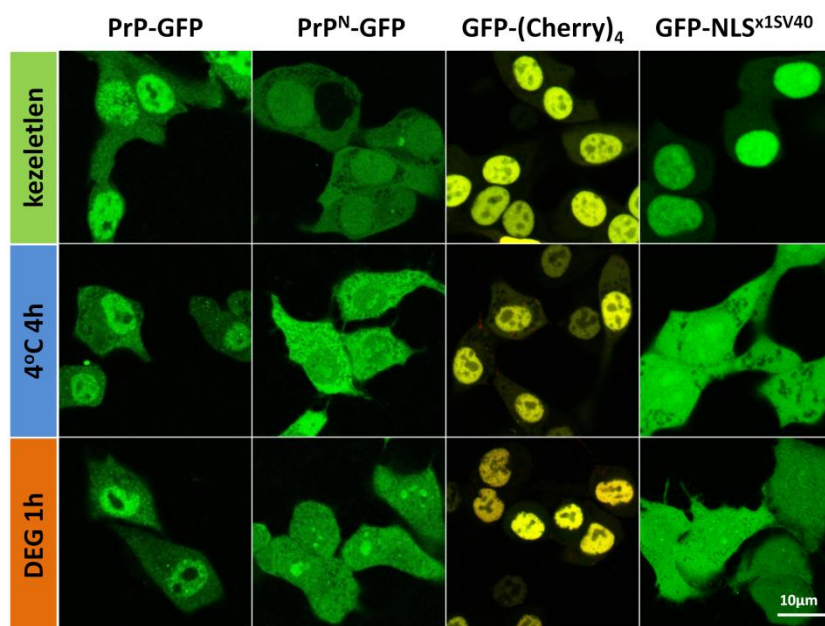


24. ábra Az aktív folyamatok blokkolásának hatása a Shadoo fehérje sejtmagi dúsulására HeLa sejtekben

A.) A hűtés (4°C) és deoxy-glükóz (DEG) kezelések hatása a Shadoo fehérje és más kontroll fehérjék sejtmagi dúsulására HeLa sejtekben ($p < 0,001$ ***). A sejtmagi kötőpartnerrel nem rendelkező GFP-(Cherry)₄-NLS^{1SV40} sejtmagi dúsulása nem változott a kezelések hatására, tehát a sejtmagpórus komplexek nem sérültek. A kötőpartnerrel nem rendelkező GFP-NLS^{1SV40} sejtmagi dúsulása megszűnt a kezelések hatására (pozitív kontroll), ellenben a GFP-NLS^{3SV40} sejtmagi dúsulása nem változott a kezelések során (negatív kontroll). A ΔSS-YFP-Sho, a ΔSS-Sho-YFP és a GFP-(RXXX)₈ fúziós fehérjék sejtmagi lokalizációja megszűnt, kivéve a nukleoluszokban. **B.)** Reprezentatív konfokális mikroszkópos felvételek a ΔSS-YFP-Sho, a ΔSS-Sho-YFP, a GFP-(RXXX)₈, a GFP-(Cherry)₄-NLS^{1SV40}, a GFP-NLS^{1SV40} és a GFP-NLS^{3SV40} fúziós fehérjékről HeLa sejtekben (zöld: YFP/GFP, sárga: Cherry és GFP felvétel összeillesztve).

A prion fehérje esetében a hűtés és deoxy-glükóz kezelések nem változtatták meg a PrP-GFP fúziós fehérje lokalizációját, mely azt sugallja, hogy a prion fehérje rendelkezik valamilyen sejtmagi kötőpartnerrel. Ez a kötőpartner nem tud nyilvánvalóan kapcsolódni csak

a prion fehérje N-terminálisához, ott ugyanis az enyhe sejtmagi dúsulás a kezelések következtében megszűnt, kivéve a nukleoluszokban (25. ábra). Érdekes, hogy a teljes PrP szekvenciát tartalmazó fúziós fehérjék (PrP-GFP) kizáródnak a sejtmagvacskákból, míg a C-terminális hiányában (PrP^N-GFP) a kezeléseket követően nukleoláris dúsulás figyelhető meg (25. ábra).



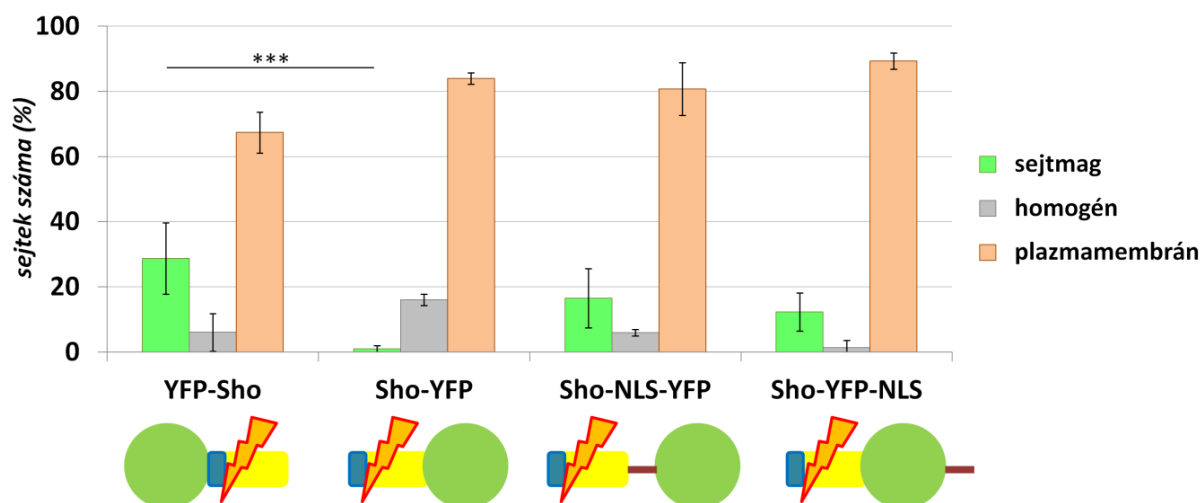
25. ábra A prion fehérje lokalizációjának változása az aktív folyamatok blokkolásával

Reprezentatív konfokális mikroszkópos felvételek a PrP-GFP, a PrP^N-GFP, a GFP-(Cherry)₄-NLS^{x1SV40} és a GFP-NLS^{x1SV40} fúziós fehérjékről N2a sejtekben hűtés és deoxy-glükóz kezelés hatására (zöld: YFP/GFP, sárga: Cherry és GFP felvétel összeillesztve). SV40 NLS: Simian Vacuolating Virus 40 nukleáris lokalizációs szignál.

Összefoglalva, kimutattuk, hogy a YFP fúziós Shadoo fehérje – hasonlóan a prion fehérjéhez – egy kettős lokalizációjú fehérje, megfigyelhető a szekréciós útvonalon, a plazmamembránban, a sejtmagban és a sejtmagvacskában is. A Shadoo fehérje dúsulásáért az N-terminális, konzervált (RXXX)₈ motívum felelős. A Shadoo fehérje feltehetően diffúzióval jut át a sejtmag pórus komplexeken. A sejtmagi dúsulása aktív folyamat függő, feltehetően kötőpartnerének lokalizációja változik az aktív folyamatok blokkolásával. Ezzel szemben a prion fehérje sejtmagi dúsulása aktív transzport révén valósul meg.

4. A Shadoo fehérje endoproteolízise

A különböző orientációban elkészített Shadoo és YFP fúziós fehérjék sejtszintű lokalizációja eltérő volt (lásd IV./2.1 fejezet) (10. ábra). Ez a különbség magyarázható lehet egy, a Shadoo fehérje N-terminálisa után történő proteolitikus hasítással [120]. Amennyiben ez a hasítás mindkét fúziós fehérje esetén megtörténik, úgy a YFP-Sho fúziós fehérjéből a YFP-hez továbbra is hozzá fog kapcsolódni a sejtmagi lokalizációt előidéző szekvencia és ennek lokalizációja így követhető. Míg a Sho-YFP esetében az NLS és a YFP szeparálódik az NLS után történő proteolitikus hasítás következtében és így a YFP-t továbbra is a membránba rögzülve látjuk, a leváló N-terminális fragmens pedig ezután nem detektálható. A proteolitikus hasítás pontos helye nem ismert: az α hasítási hely valahova a 78-100-as aminosavak közé tehető, a β hasítási hely pedig a 30-61-es aminosavak közé [120]. Annak érdekében, hogy igazoljuk a Sho-YFP fúziós fehérje esetében is a szekréciós útvonalról történő kilépést és azt az elméletet, hogy a Sho-YFP esetében az NLS szeparálódik a YFP-től, elkészítettünk olyan fúziós fehérjéket, melyekben vagy a Shadoo és a YFP közé vagy a YFP után egy második nukleáris lokalizációs szignált illesztettünk (Sho-NLS-YFP, Sho-YFP-NLS). A konstrukciók N-terminálisán továbbra is megtalálható a szekréciós szignál, C-terminálisán pedig a GPI-horgony szignál szekvencia. A 26. ábrán látható, hogy mind a Sho-NLS-YFP, mind pedig a Sho-YFP-NLS mutatnak sejtmagi dúsulást, ezek alapján pedig a Sho-YFP fehérje valószínűleg ugyanúgy bekerül a citoszolba, mint a YFP-Sho, csak nem rendelkezik már az N-terminális (RXXX)₈ motívummal, így esetében sejtmagi dúsulás nem figyelhető meg, csak homogén lokalizáció (26. ábra). A hasítóhely pontos feltérképezésére különböző fúziós konstrukciókat terveztünk, ám ezek klónozásával és emlős sejtekben történő kiértékelésével a dolgozat leadásáig nem végeztünk.



26. ábra A YFP-Sho, Sho-YFP, Sho-NLS-YFP és Sho-YFP-NLS fúziós fehérjék lokalizációja HeLa sejtekben

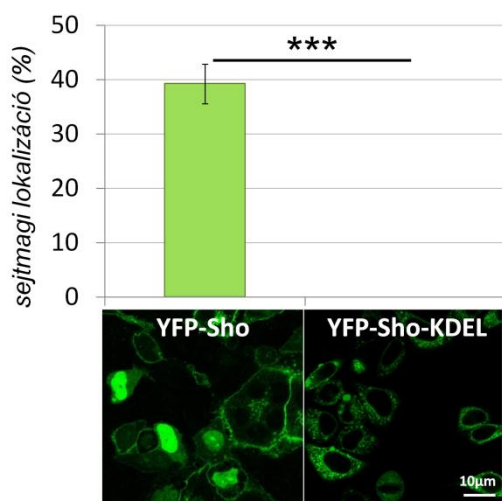
A YFP-Sho, Sho-YFP, Sho-NLS-YFP és Sho-YFP-NLS fúziós fehérjék lokalizációjának megoszlása HeLa sejtekben ($p < 0,001$ ***). A kísérletet háromszor ismételtük és minden esetben legalább 100 sejtet számoltunk le. Sejtmag: a fluoreszcens fehérje intenzitása magasabb a sejtmagban, mint a citoszolban; homogén: a fluoreszcens fehérje intenzitása megközelítőleg megegyezik a sejtmagban és citoszolban; plazmamembrán: a fúziós fehérje a plazmamembránban lokalizálódik. A grafikon alatt az egyes konstrukciók sematikus felépítése (zöld kör: YFP, kék: $(RXXX)_8$, sárga: a Shadoo fehérje $(RXXX)_8$ motívumot követő része, bordó vonal: SV40 NLS) és a potenciális endoproteolitikus hasítás (villám) látható. Minden fúziós fehérje rendelkezett szekréciós és GPI-horgony szignál szekvenciákkal.

5. A Shadoo fehérje útvonala a sejtben

Eddig kísérleteink és eredményeink összegzéséből az látszik, hogy a Shadoo fehérje megfordul a szekréciós útvonal különböző állomásain, a plazmamembránban és a sejtmagban is. A Shadoo fehérje sejtmagi lokalizációjának pontosabb megértéséhez először az ide vezető útvonalat szeretnénk volna felderíteni. A Shadoo fehérje útvonalának részletesebb feltérképezésére számos kísérletet terveztünk. A szintetizálódó és érő polipeptid útvonalát nyomon követtük különböző mutáns fúziós fehérjék segítségével, megakasztottuk különböző transzport blokkolókkal, illetve kompartment rezidens horgony fehérjékkel.

5.1 A Shadoo fehérje szekréciós szignál szekvenciájának hatékonysága

Először vizsgáltuk az ER-be történő transzlokáció hatékonyságát, hiszen ha a szintézis során a képződő polipeptid lánc nem kerül be az ER-be, akkor a citoszolikus Shadoo fehérje NLS-ének közvetítésével a sejtmagban fog dúsulni. Minden esetben olyan konstrukciókat készítettünk, amelyekben a YFP kezdő metioninját leucinra cseréltük (lásd IV./2.1-es fejezet). Megakasztottuk a frissen szintetizált, az ER-be került fehérjéket egy endoplazmatikus retenciós szignállal, és vizsgáltuk a fúziós fehérjék lokalizációját. Ehhez egy olyan fúziós konstrukciót készítettünk, melyben a YFP-Sho fúziós konstrukció végére egy rövid, négy aminosavas (KDEL) ER retenciós szignált illesztettünk (YFP-Sho-KDEL). Ilyen módon az ER-be jutott fehérjék nem indulnak tovább a szekréciós útvonalon, hanem az ER-ben megakadnak. Viszont azok a fehérjék, melyek a nem hatékony transzlokáció miatt a citoszolban maradnak, bekerülnek a sejtmagba. A fúziós fehérje lokalizációját HeLa sejtekben vizsgáltuk konfokális lézer pásztázó mikroszkóppal. Az eredmény a 27. ábrán látható, a KDEL retenciós szignál visszatartotta az ER-be került fehérjéket, membrán lokalizációt a vártan megfelelően nem tapasztaltunk, továbbá sejtmagi lokalizációt sem láttunk. Tehát a Shadoo fehérje szekréciós szignál szekvenciája megfelelő hatékonysággal működik, a citoszolban és sejtmagban nincs detektálható fehérje, a kettős lokalizációt tehát nem az elégtelen hatékonyságú kotranszlációs transzlokáció okozza [121].



27. ábra A Shadoo fehérje szekréciós szignál szekvenciájának hatékonysága

A YFP-Sho és YFP-Sho-KDEL fúziós fehérjék esetében tapasztalt sejtmagi dúsulás összehasonlítása HeLa sejtekben ($p < 0,001$, ***). A kísérleteket háromszor ismételtük és minden esetben legalább 100 sejtet számoltunk le. A grafikon alatt az egyes fúziós fehérjék lokalizációjáról készült reprezentatív konfokális mikroszkópos képek láthatóak (zöld: YFP).

A YFP-Sho-KDEL konstrukciót és az ezzel kapcsolatos kísérleteket Vodicska Barbara szakdolgozó készítette [121].

Az előbbieken bemutatott kísérletek eredményeiből az következik, hogy a Shadoo fehérje bekerül a szekréciós útvonalra, majd annak valamely állomásáról lép ki. A szekréciós útvonalról a citoszolba történő távozás vizsgálata mindenképpen érdekes, mind a Shadoo fehérje, mind pedig általános sejtbiológiai szempontból. A feltételezett útvonalakat

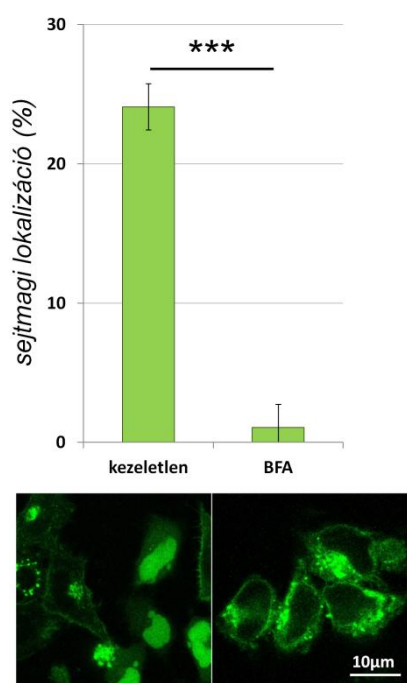
összefoglalva nem konvencionális szekréciós útvonalaknak neveztük és a későbbiekben ezek azonosítását és feltérképezését tűztük ki célul a Shadoo fehérje segítségével. A szekréciós útvonalon vizsgáltuk - mint lehetséges kilépési pontot - az ER-t, külön fókuszálva az ER-asszociált degradációs (ERAD) útvonalra, illetve tervezzük vizsgálni a Golgi ciszternák területéről történő kilépést is.

5.2 Az endoplazmatikus retikulum, mint a nem konvencionális szekréciós útvonalak lehetséges kilépési pontja

Az ER-ből történő kilépés vizsgálatát több oldalról közelítettük meg. Egyrészt az irodalomból ismert ER – Golgi ciszternák közötti átmenet blokkolásával, Brefeldin A segítségével. A Brefeldin A egy lakton antibiotikum, amely a COPII mediált vezikulaformálás blokkolásával gátolja az ER és a Golgi apparátus közötti transzportot és serkenti a cisz-Golgi hálózathoz kiinduló retrográd transzportot [122]. Másrészt ER-rezidens horgony fehérjékkel történő kompartmentum specifikus megakasztással (RUSH rendszer – *retention using selective hooks* = megakasztás szelektív horogfehérjék segítségével) vizsgáltuk a sejtmagi lokalizáció meglétét vagy hiányát [123]. A RUSH rendszer lényege, hogy létrehoznak egy kompartment rezidens sztreptavidin-konjugált horgony fehérjét, melyhez a sztreptavidin kötő doménnel (SBP – *streptavidin binding peptide*) fúzióban levő vizsgált fehérje hozzákapcsolódik. Ez a kapcsolat biotin hozzáadással megszüntethető, így a rendszer egyaránt alkalmas a szintetizálódó fehérjék megakasztására, a sejtek szinkronizálására, illetve a továbbengedett fehérje útvonalának monitorozására. A RUSH rendszeres kísérleteket Vodicska Barbara szakdolgozó végezte, az ezzel kapcsolatos eredményeket a dolgozatban nem mutatom be [121]. Harmadrészt vizsgáltuk külön az ER-asszociált degradációs útvonalat, hiszen elképzelhető, hogy ezen útvonal segítségével a citoszolba kerülő fehérjék egy része elkerüli a degradációt és a sejtmagba jut. Az ERAD blokkolását Eeyarestatin I-gyel végeztük. Az Eeyarestatin I blokkolja a különböző deubikvitinációs folyamatokat, ezáltal az ERAD-ot [124,125].

i.) Brefeldin A kezelés eredménye

YFP-Sho transzfektált HeLa sejteket kezeltük 5 µg/ml Brefeldin A-val (BFA). A kezelést a transzekciót követő 3. órában kezdtük meg, amikor a transzfektált fúziós fehérje expressziója még nem detektálható. 5 órás BFA kezelést követően a sejteket fixáltuk és konfokális lézer pásztázó mikroszkóppal vizsgáltuk a lokalizációt. A 28. ábrán látható, hogy a kezelés hatására a fúziós fehérje nem jutott ki a plazmamembránba, viszont a sejtmagban sem tapasztaltunk jelet. Az eredményekből arra lehet következtetni, hogy a szekréciós útvonalról történő kilépés helye feltehetően az ER-t és a cisz-Golgi ciszternát követően található. Ezt az eredményt alátámasztották a RUSH rendszerben kapott eredmények is [121].



28. ábra *Brefeldin A kezelés hatása a YFP-Sho transzfektált HeLa sejtekre*

*5 órás Brefeldin A (BFA) kezelés hatására a YFP-Sho fúziós fehérje minden sejtben intracelluláris vezikulákban (feltehetően ER) figyelhető meg. A reprezentatív felvételek konfokális lézer pásztázó mikroszkóp segítségével készültek. A kísérletet legalább háromszor ismételtük és minden kísérletben 300 sejtet számoltunk, *** $p < 0,001$.*

ii.) Eeyarestatin I kezelés eredménye

Az ER-ből a nem megfelelő konformációjú fehérjék az ER asszociált degradációs útvonalon kerülnek ki a citoszolba. Ezt az útvonalat specifikusan lehet blokkolni Eeyarestatin I-gyel (EeyI) [124,125]. A YFP-Sho transzfektált HeLa sejteket 5 órán át kezeltük Eey I-gyel, majd vizsgáltuk a sejtmagi lokalizációt. A kezelés hatására nem változott meg a YFP-Sho sejtmagi dúsulásának aránya, tehát feltehetően nem az ER asszociált degradációs útvonalon kerül ki a YFP-Sho sejtmagi formája (az eredményeket a dolgozatban nem mutatom be).

Ezen eredményekből arra a következtetésre jutottunk, hogy a Shadoo fehérje nem az elégtelen hatékonyságú kotranszlációs transzlokáció miatt kerül a citoszolba, hanem bekerül az ER-be. Továbbá kísérleteink arra mutatnak, hogy a sejtmagi forma nem az ER-ből, hanem a szekréciós útvonal egy későbbi, az ER-t követő állomásáról jut ki a citoszolba, illetve a sejtmagba. A KDEL ER-retenciós szignállal rendelkező fehérjék bekerülhetnek a transzport vezikulákba, de a cisz-Golgi területéről retrográd transzporttal visszakerülnek az ER-ba. Brefeldin A-val történő kezelés hatására a cisz-Golgi hálózatból induló retrográd transzport serkentődik. Összegezve az eredményeket nem valószínű, hogy a Shadoo fehérje az ER területéről az ER-asszociált degradációs útvonalon vagy más transzlokátoron, illetve, hogy a cisz-Golgi hálózat területéről kerülne ki a szekréciós útvonallal.

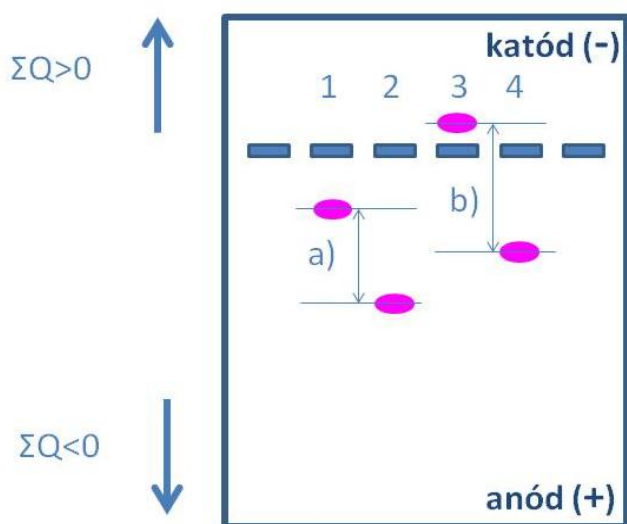
6. A Shadoo fehérje nukleinsav kötése

Az előbbi fejezetekben megmutattuk, hogy a Shadoo fehérje rendelkezik nukleáris lokalizációs szignállal és feltehetően megfordul a sejtmagban. Corley és munkatársai leírták, hogy a Shadoo fehérje rendelkezik egy RGG-box motívummal, mely az eddigi adatok alapján RNS-t köthet és/vagy részt vehet fehérje-fehérje kölcsönhatásokban. Ezek alapján vizsgálni szeretnénk volna a Shadoo fehérje RNS és/vagy DNS-kötését.

6.1 A fehérje – nukleinsav kötés egyszerű vizsgálatához használt agaróz gélshift módszer bemutatása

A fehérje – nukleinsav kötést egy egyszerű és gyors rendszerben szeretnénk volna vizsgálni karcinogén és/vagy radioaktív anyagok használata nélkül. Ehhez az agaróz gélshift módszert választottuk, mely azon alapul, hogy a kötés által megváltozott összetöltésű fehérje – nukleinsav komplex eltérően fut agaróz gélen, mint a komplex tagjai külön-külön. Agaróz gélen a nukleinsavak futásbeli változását szokás követni tipikusan izotopos jelöléssel vagy a szálak közé interkalálódó festékek használatával. A módszert tovább módosítottuk úgy, hogy a fehérjék *shift*-jét (futásbeli eltolódását) is tudjuk detektálni Cherry fluoreszcens fúziós partner segítségével. A fehérjék hidrodinamikai sugaruk és összetöltésük által meghatározott

sebességgel vándorolnak az agaróz gélben elektromos erőtér hatására. A negatív töltésű nukleinsavak kötésével a komplex össztöltése megváltozik és az „üres” fehérjéhez képest nettó töltésük negatívabb lesz, ami futásbeli eltolódásban mutatkozik meg (29. ábra). A *shift* szélsőséges esetben akár a futás irányát is megváltoztathatja (29./b ábra).



29. ábra A fehérje nukleinsav-kötés hatására megváltozó össztöltés okozta mobilitás változás agaróz gélen

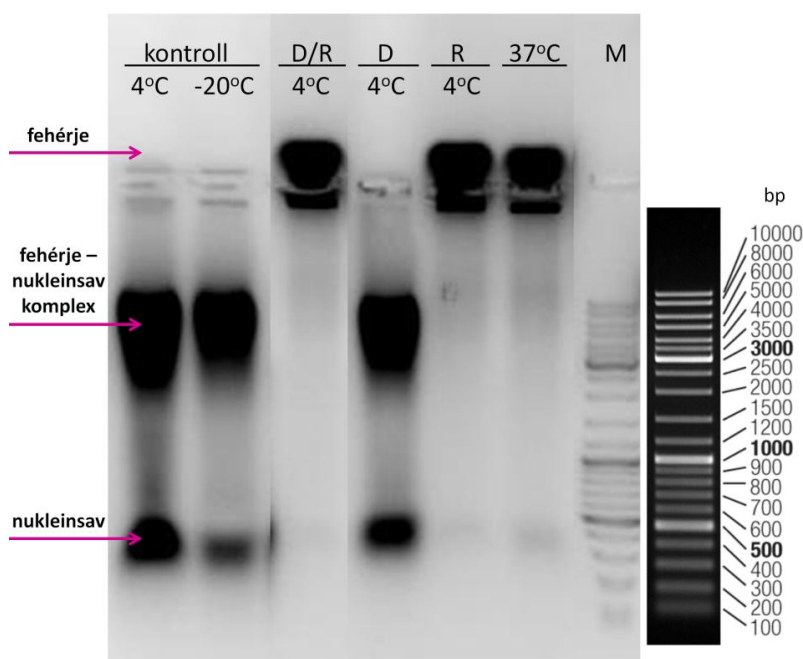
a.) Az adott pH-n negatív nettó töltésű fehérjék az anód felé vándorolnak 1%-os agaróz gélen (1). Nukleinsav kötés hatására a komplex össztöltése negatívabb lesz és mobilitása megváltozik (2). b.) Az adott pH-n pozitív nettó töltésű fehérjék a katód felé vándorolnak 1%-os agaróz gélen (3). Nukleinsav kötés hatására a komplex össztöltése negatívabb lesz, szélsőséges esetben annyira, hogy a létrejött fehérje-nukleinsav komplex már a pozitív pólus felé fog vándorolni (anód) (4). Az agaróz gél felső negyedénél található kék csíkok a minták

felvitelére szolgáló zsebeket, ezáltal a futtatás kiindulási pontját jelölik. Az ábrát Vida István szakdolgozó készítette [126].

6.2 A Shadoo fehérje nukleinsav kötésének jellemzése

A Shadoo fehérje nukleinsav kötésének vizsgálatához elkészítettük a Cherry-Sho és Cherry bakteriális expressziós konstrukciókat [126]. Egyik első megfigyelésünk az volt, hogy a Cherry-Sho fúziós fehérje attól függően, hogy a mintát 4°C-on vagy 37°C-on tartottuk, eltérő futási képet mutatott. A 37°C-on inkubált minta (37°C, 30 perc) a prediktált pozitív össztöltésének megfelelően a katód irányába futott, míg a 4°C-on tartott minta az anód felé vándorolt (30. ábra). Feltételeztük, hogy ez az anód irányú eltolódás a baktérium sejtekből származó nukleinsavak eredménye, ezért kezeltük a mintákat DNázzal (D), RNázzal (R) és a kettővel együttesen (D/R) fél órán keresztül 4°C-on. Az eredmény a 30. ábrán látható, az RNáz és a két enzimmel történő együttes kezelés esetében a 37°C-os mintához hasonló futási képet kaptunk. A DNáz és RNáz aktivitását és az esetleges szennyezettséget ellenőriztük és nem tapasztaltunk problémát. A baktériumokból izolált és tisztított Cherry-Sho fehérje feltehetően bakteriális RNS-t köt, ami az alkalmazott mosási lépéseket követően is kötve marad a fehérjéhez, azonban RNáz kezeléssel vagy a minta 37°C-on történő inkubációjával – mely feltehetően a mintában kis mennyiségben szennyezésként jelen levő endogén

RNázoknak kedvez – a kötött RNS eliminálható. A további kísérletekben, amikor a fehérje nukleinsav kötését vizsgáltuk, a mintákat RNázal előkezeltük. A kontrollként használt Cherry fehérje nem kötött detektálható mennyiségben bakteriális nukleinsavakat, a különböző kezelések hatására nem változott meg a futási képe, ennek ellenére – hogy megfelelő kontrollként szolgálhasson – az RNáz kezelési lépést itt is minden kísérletben alkalmaztuk. A módszer beállítása során eleinte használtunk etídium-bromid festést, hogy összevethessük a fúziós fehérje és a DNS futási képét. A kötés következtében kapott futásbeli eltolódás mind szabad szemmel, mind etídium-bromid festéssel látható volt.



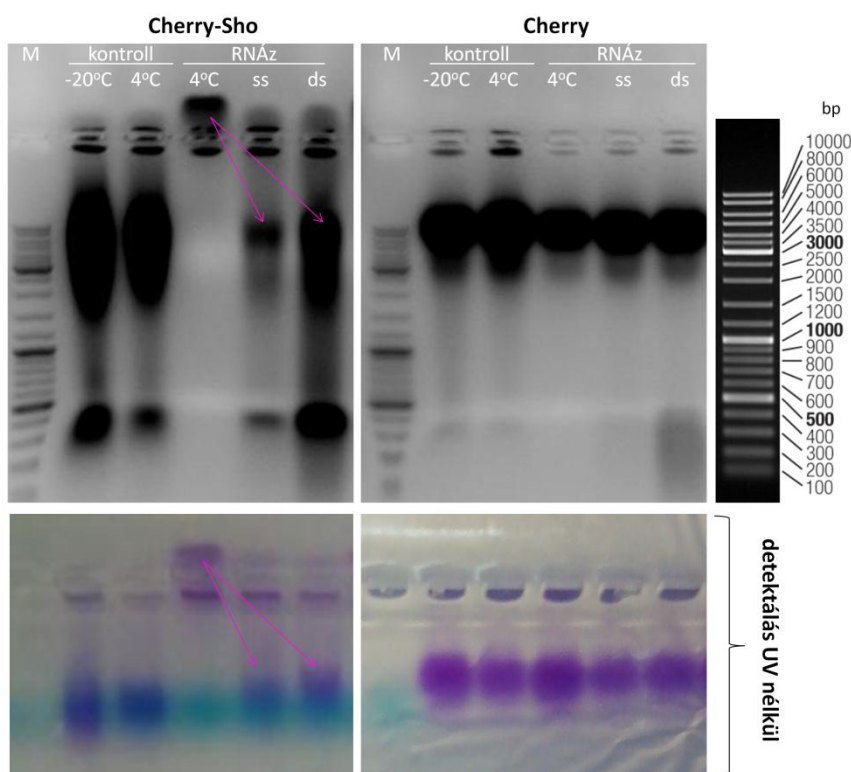
30. ábra a Cherry-Sho fúziós fehérje futási képe különböző kezelések hatására

A Cherry-Sho fehérje köti az endogén bakteriális RNS-eket (-20°C-on és 4°C-on tartott kontroll minták). A kötés megszüntethető 37°C-os inkubációval és RNáz (R, D/R) kezeléssel. A DNáz kezelés (D) nem változtatta meg a komplex mobilitását a kontroll mintákhoz képest. A minták között más, a jelenlegi ábra szempontjából nem releváns minták is voltak, melyeket utólag kivágtunk a könnyebb érthetőség kedvéért. A kísérletek ezen korai fázisában még nem készült UV

megvilágítás nélküli kép. A minták 1%-os agaróz gélen futtattuk, M: GeneRuler DNA Ladder Mix.

A továbbiakban a Shadoo fehérje egyszálú és kétszálú DNS oligonukleotid kötését vizsgáltuk. Az általunk használt DNS oligonukleotid egy szintetikus, random 41 bázispáros oligomer volt. A fúziós fehérje nukleinsav kötését mindig az RNáz kezeletlen, endogén bakteriális RNS-t tartalmazó kontrollokhoz hasonlítottuk. A 31. ábrán látható, hogy az RNáz kezelést követően 4°C-on inkubált Cherry-Sho minta a várt irányba, a katód felé mozdult el, míg az egy- és kétszálú DNS oligonukleotiddal inkubált minták a kezeletlen kontrollokhoz hasonló képet mutattak. Elvégezve ugyanezen kísérleteket a Cherry fehérjén nem tapasztaltunk semmilyen változást a fehérje mobilitásában (31. ábra).

Vizsgáltuk a Cherry-Sho fúziós fehérje kisebb (minimum 10 nukleotidos), nagyobb méretű (~5000 bp) cirkuláris és lineáris plazmid DNS és egyszálú és kétszálú RNS kötését is. Hasonló kötést sikerült detektálni, mint a rövid DNS oligonukleotidok esetében. Ezeket a további kísérleteket Dr. Major Balázs és Vida István munkatársaim végezték, és az ezzel kapcsolatos részletes eredményeket dolgozatomban nem mutatom be.



31. ábra A Cherry-Sho és Cherry fehérjék mobilitásának változása egy- és kétszálú DNS oligonukleotid hatására agaróz gélen

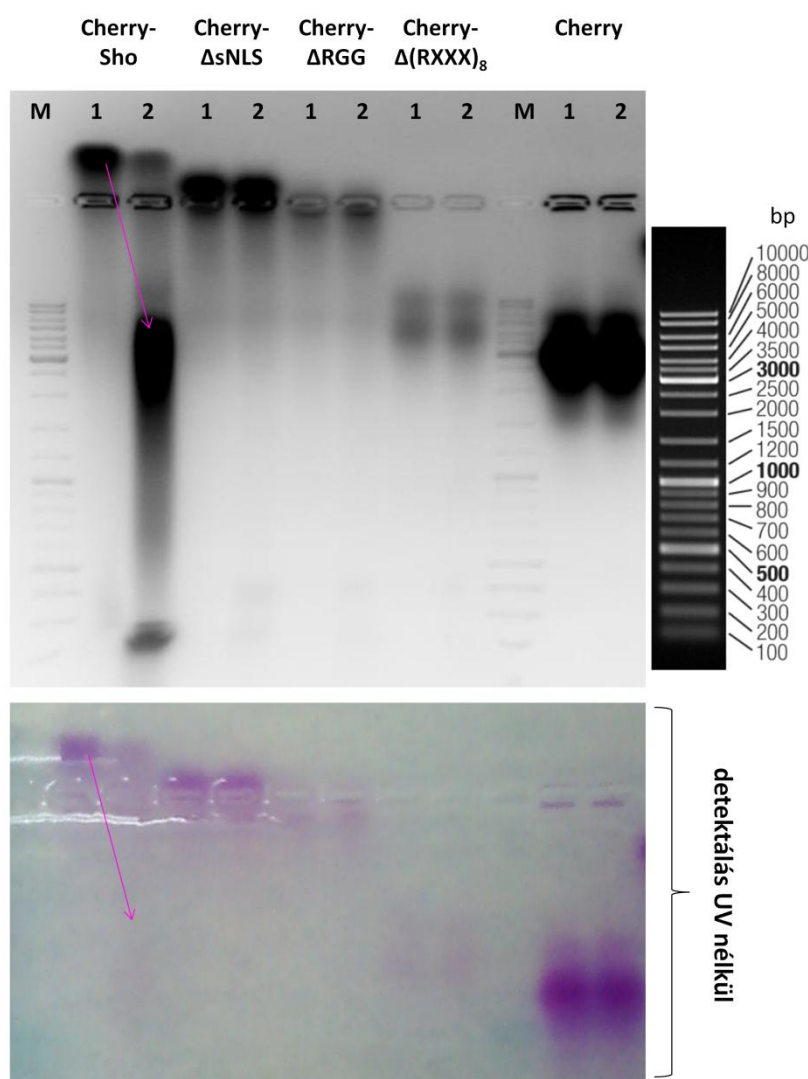
Bal oldali gél: Az RNáz kezelt Cherry-Sho (RNáz 4°C) mobilitásának változása egy- (ss = single stranded) és kétszálú (ds = double stranded) DNS oligonukleotid hatására a kezeletlen, endogén RNS-t kötő kontrollokhöz (kontroll: -20°C, 4°C) hasonlítva 1%-os agaróz gélen (shift = rózsaszín nyíl). Mind az egy, mind pedig a kétszálú DNS oligonukleotid kötődött a Cherry-Sho fúziós fehérjéhez. A szálak közé

interkalálódó festék az egyszálú oligonukleotidot nagyon gyengén festi. **Jobb oldali gél:** Az RNáz kezelt Cherry (RNáz 4°C) mobilitásának változása egy- (ss = single stranded) és kétszálú (ds = double stranded) DNS oligonukleotid hatására a kezeletlen, bakteriális RNS-t kötő kontrollokhöz (kontroll: -20°C, 4°C) hasonlítva 1%-os agaróz gélen. Az alsó kép a felső kísérlet ismétléséről készült. Nem detektálható semmilyen kötődés a Cherry fehérje és a DNS oligonukleotidok között. Az alsó színes fotók UV megvilágítás nélkül készültek. M: GeneRuler DNA Ladder Mix.

6.3 Az sNLS, RGG, és (RXXX)₈ motívumok nukleinsav kötésének vizsgálata deléciók és fúziós konstrukciókkal

6.3.1 Deléciós fehérjék kettős szálú DNS oligonukleotid kötése

A továbbiakban a Shadoo fehérje különböző N-terminális deléciós mutánsainak nukleinsav kötését tanulmányoztuk. A Shadoo N-terminálisának vizsgálata azért volt indokolt, mert ez a régió tartalmazza az RNS-kötő motívumként jellemzett RGG-boxot, illetve nettó pozitív töltése révén könnyen asszociálódhat negatív össztöltésű molekulákhoz. A létrehozott deléciós mutánsokból sorra egyre hosszabb szekvenciák hiányoznak (Δ sNLS, Δ RGG, Δ (RXXX)₈), így megfigyelhetővé válik, hogy melyik szekvencia eltűnése okoz funkcióvesztést vagy zavart a nukleinsav kötésre nézve.



32. ábra A Cherry-Sho deléciós mutánsok kétszálú DNS oligonukleotid kötése

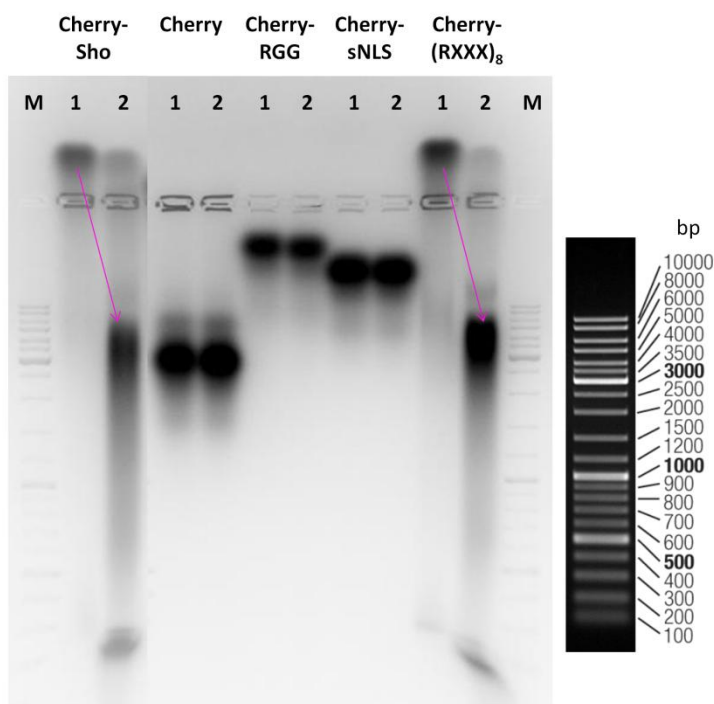
Míg a kontrollként használt RNáz kezelt Cherry-Sho képes a kétszálú DNS oligonukleotid megkötésére, addig az egyes deléciós mutánsok (Cherry- Δ sNLS, Cherry- Δ RGG, Cherry- Δ (RXXX)₈) – hasonlóan a Cherry fehérjéhez – nem kötik az általunk használt DNS oligonukleotidot (shift = rózsaszín nyíl). Az alsó színes fotók UV megvilágítás nélkül készültek.

1 = RNáz kezelt minta oligonukleotid nélkül inkubálva, 2 = RNáz kezelt minta kétszálú DNS oligonukleotiddal inkubálva, M = GeneRuler DNA Ladder Mix

Mindhárom deléciós mutánst (Cherry- Δ sNLS, Cherry- Δ RGG, Cherry- Δ (RXXX)₈), illetve a kontrollként használt Cherry-Sho és Cherry fehérjét RNázal kezeltek, majd az előző kísérletekben használt kétszálú szintetikus DNS oligonukleotiddal inkubáltuk őket 4°C-on egy éjszakán át. Az egyes fúziós fehérjék mobilitás változását 1%-os agaróz gélen detektáltuk. A 32. ábrán látható, hogy mindhárom delécia megszüntette a Shadoo fehérje DNS oligonukleotid kötő képességét.

6.3.2 Fúziós fehérjék kettős szálú DNS oligonukleotid kötése

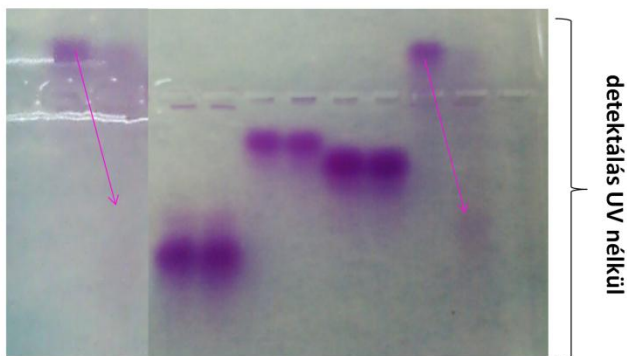
A deléciós mutánsok mellett a deletált szekvenciákat önmagukban is vizsgáltuk Cherry fúziós partnerrel (Cherry-sNLS, Cherry-RGG, Cherry-(RXXX)₈), hogy melyik az a legrövidebb szekvencia, ami már tud nukleinsavakat kötni.



33. ábra A Cherry-sNLS, Cherry-RGG és Cherry-(RXXX)₈ fúziós fehérjék kétszálú DNS oligonukleotid

Az RNáz kezelt Cherry-(RXXX)₈ képes a kétszálú DNS oligonukleotid megkötésére hasonlóan a Cherry-Sho fehérjéhez. Ezzel szemben a Cherry-sNLS és Cherry-RGG fúziós fehérjék a Cherry fehérjéhez hasonlóan nem kötik a kétszálú DNS oligonukleotidot (shift = rózsaszín nyíl). Az alsó színes fotók UV megvilágítás nélkül készültek.

1 = RNáz kezelt minta oligonukleotid nélkül inkubálva, 2 = RNáz kezelt minta kétszálú DNS oligonukleotiddal inkubálva, M = GeneRuler DNA Ladder Mix



A tisztított fehérjét RNÁzzal kezeltük, majd a korábbi kísérletekben használt kétszálú DNS oligonukleotiddal inkubáltuk 4°C-on egy éjszakán át. A fehérjék mobilitás változását 1%-os agaróz gélen detektáltuk. Kontrollként a Cherry és Cherry-Sho fúziós fehérjét használtuk. A 33. ábrán látható, hogy a leghosszabb szekvencia [(RXXX)₈ motívum], hasonlóan a Cherry-Sho-hoz képes a kettőszálú DNS oligonukleotid megkötésére.

Az eredményeket összefoglalva, deléciós és fúziós konstrukciókkal is megmutattuk, hogy a Shadoo fehérje képes egy- és kétszálú DNS oligonukleotid, illetve endogén bakteriális RNS kötésére. Deléciós és fúziós konstrukciókkal is igazoltuk, hogy a nukleinsav kötéshez elengedhetetlen az N-terminális, pozitívan töltött (RXXX)₈ motívum. Munkánkkal párhuzamosan Lau és munkatársai is igazolták a Shadoo fehérje nukleinsav kötését *in vitro* körülmények között [69].

7. Az endogén Shadoo fehérje sejtszintű lokalizációja – anti-Shadoo antitestek

A legnagyobb probléma a Shadoo fehérje lokalizációjának meghatározásában a megfelelő specifitású antitestek hiánya. Vizsgáltuk a kereskedelmi forgalomban kapható mindhárom antitestet (Santa Cruz R-12 anti-mouse Shadoo, Santa Cruz S-12 anti-human Shadoo, Abgent anti-human Shadoo), mindemellett öt anti-Shadoo antitestet is próbáltunk készíttetni (1. táblázat). Az antitesteket használat előtt teszteltük. Vizsgáltuk az immunfestést számos különböző sejtvonalon, YFP-Sho, Sho-YFP és YFP-GPI transzfektált HeLa sejteken, antitest - peptid kompetíciós kísérletekben és Western bloton. A kísérletekből levont tanulságokat és negatív eredményeket röviden összefoglalom a következő bekezdésekben és a 2. táblázatban (a részletes eredményeket a dolgozatban nem mutatom be).

No.	antitest neve	rövidítés	célszekvencia	gazdaállat / klonalitás
1.	Santa Cruz R-12	R-12	egér ?	nyúl poliklonális
2.	Santa Cruz S-12	S-12	humán ?	nyúl poliklonális
3.	Abgent anti-Sho	AG	humán 83-113	nyúl poliklonális
4.	anti-Sho RP61	-	egér 42-56	nyúl poliklonális
5.	anti-Sho RP62	RP62	egér 85-100	nyúl poliklonális
6.	anti-Sho RP63	-	egér 85-100	nyúl poliklonális
7.	anti-Sho RP64	-	egér 85-100	nyúl poliklonális
8.	anti-Sho CP65	-	egér 108-116	csirke poliklonális

1. táblázat A kereskedelmi forgalomban kapható (kék), illetve kutatócsoportunk által rendelt (narancssárga) anti-Shadoo antitestek listája, célszekvenciája és klonalitása. A rendelt antitestek közül egyedül az RP62-es jutott el a tesztelés fázisába.

- i.) Különböző sejtvonalakon kapott immunfestés eredménye: A vizsgált antitestekkel (R-12, S-12, AG, RP62) különböző idegi és nem idegi eredetű, humán és egér sejtvonalakat festettünk. S-12 és RP62 antitesttel sejtvonaltól függetlenül mindig sejtmagi festődést kaptunk. R-12 antitesttel HeLa sejteken sejtmagi festődést tapasztaltunk, a további vizsgált sejtvonalakon különböző fibrilláris citoszolikus struktúrák festődtek. AG antitesttel a humán sejtvonalakon sejtmagi festődést, az egér sejtvonalakon citoszolikus festődést tapasztaltunk.
- ii.) YFP-Sho, Sho-YFP transzfektált sejtek immunfestése: Az AG antitest megfelelően követte a membrán-, intracelluláris vezikula és sejtmagi jeleket. Az R-12 és RP62 antitestek a membrán és intracelluláris vezikulák esetében mutattak kolokalizációt a YFP jellel. A sejtmagok esetében nem tapasztaltunk intenzitásváltozást. Az S-12 antitest nem követte a transzfektált jelet.
- iii.) Antitest-peptid kompetíciós kísérletek: Az S-12 antitest gyakorlatilag minden hozzáadott peptiddel blokkolható volt. Az RP62 antitest megfelelően volt blokkolható saját specifikus peptidjével, míg az AG és R-12 antitestek esetében 1:500-es és 1:5000-es feleslegben hozzáadott peptid esetében tapasztaltunk enyhe blokkolást.
- iv.) Western blot sejtlizátumon: Az AG és R-12 antitestek megfelelő magasságban detektálták a Shadoo fehérjét, azonban rengeteg keresztreakciót tapasztaltunk. Az S-

12 és RP62 antitestek a keresztreakción túl semmilyen specifikus festődést nem mutattak.

	sejtpanel	transzfektált sejtek	kompetíció	western blot
R-12	sejtmag / citoszolikus filamentum	membrán, vezikulák	1:5000	+
S-12	sejtmag	-	1:50, nem specifikus	-
AG	humán: sejtmag, egér: citoszol	membrán, vezikulák, sejtmag	1:500	+
RP62	sejtmag	membrán, vezikulák	1:100	-

2. táblázat A különböző antitestek teszteléseinek eredménye összefoglalva.

A röviden bemutatott eredményekből látható, hogy megpróbáltuk detektálni az endogén Shadoo-t különböző antitestekkel, de a kereskedelmi forgalomban kapható antitestekkel, illetve a rendelt antitestekkel kapott eredmények nem értékelhetők. Az R-12 antitest nem kompetálható saját specifikus peptidjével sem csak nagy feleslegben alkalmazva (1:5000), az S-12 antitest nem követi a YFP-Sho fúziós fehérjét és mindenféle peptiddel kompetálható, az RP62 antitest nem működik Western bloton és nem követi a sejtmagban a transzfektált Shadoo jelet. Az AG antitest megfelelően detektálta a transzfektált jelet (membrán, vezikulák, sejtmag), Western bloton is kimutatta a Shadoo fehérjét, ám viszonylag nagy feleslegben (1:500) hozzáadott specifikus peptiddel blokkolható. Ez utóbbi antitest (AG) feltehetően Western bloton megfelelő kontrollokkal jól használható, ám immuncitokémiás vizsgálatokra nem javasolt (2. táblázat). Mindezek alapján elmondható, hogy az endogén Shadoo fehérje nem detektálható immuncitokémiával a kereskedelmi forgalomban kapható és az általunk rendelt antitestek egyikével sem.

V. EREDMÉNYEK ÉRTÉKELÉSE / DISZKUSSZIÓ

A szivacsos agysorvadással járó betegségek kialakulásának középpontjában egy fiziológiásan, normális körülmények között is expresszáldó fehérje, a prion fehérje konformációjának megváltozása áll. A prion fehérjét számos folyamattal hozták már kapcsolatba, azonban pontos fiziológiás funkciója, illetve a betegség szempontjából releváns funkciója mindmáig ismeretlen. 2003-ban leírták a prion fehérjecsalád legújabb tagját, a Shadoo fehérjét, mely felépítését tekintve és bizonyos kísérleti felállásokban funkcionálisan is a prion fehérje analógiájának tekinthető [30,65]. A Shadoo és prion fehérjék együttes vizsgálata – különös tekintettel a hasonlóságokra és különbségekre – reményeink szerint rávilágíthat a prion fehérjecsalád kritikus funkciójára és a betegségben betöltött szerepére. Ennek a célnak az eléréséhez a Shadoo fehérje lokalizációjának ismerete fontos információ.

Ennek megvalósítására először a Shadoo fehérje intracelluláris lokalizációját vizsgáltuk. Felfigyeltünk arra, hogy a YFP fúziós Shadoo fehérje kettős lokalizációt mutatott. A kettős lokalizáció tulajdonképpen annyit tesz, hogy az adott fehérje megfigyelhető az extracelluláris kompartmentben (sejtfelszín) és az intracelluláris kompartmentben (citoszol, sejtmag) egyaránt. A kettős lokalizáció egy viszonylag ritka, bár nem példa nélküli jelenség, többnyire szignál transzdukcióban, transzkripció és sejtosztódás szabályozásban részt vevő fehérjéknél figyelhető meg. A prion fehérjéről már korábban leírták, hogy kettős lokalizációjú fehérje [127].

A transzfecció következtében fellépő overexpresszió okozhat nem megfelelő lokalizációt, az ER transzlokátorok és/vagy a proteaszóma rendszer túltelítődését, ám a hasonló fúziós fehérjék esetében (mint például YFP-PrP) sosem tapasztaltunk sejtmagi dúsulást annak ellenére, hogy a YFP-PrP fúziós fehérje szignálok nélkül képes a sejtmagban dúsulni. Továbbá az overexpresszió következtében megjelenő sejtmagi dúsulásnál a plazmamembrán jel mellett kellene látni a sejtmagi dúsulást, ám esetünkben sokszor lehet látni olyan sejteket is, ahol a plazmamembrán lokalizáció nem figyelhető meg csak a sejtmagi dúsulás (10. ábra, 11. ábra).

Úgy találtuk, hogy a prion fehérjéhez hasonlóan a Shadoo fehérje is rendelkezik nukleáris lokalizációs szignállal, amely a citoszolba kerülő fúziós fehérjét a sejtmagba irányítja. A Shadoo fehérje funkcionális nukleáris lokalizációs szignálja az extrém N-terminális erősen konzervált szekvencia. Premzl és munkatársai az N-terminális pozitívan

töltött régióban egy XXRG *tetrarepeat* motívumot (26-48-as aminosavak), az RGG-box egy változatát írták le [65]. Eredményeink alapján azonban a hosszabb (RXXX)₈ motívum (28-58-as aminosavak) képezhet funkcionális egységet. A Shadoo fehérje funkcionális nukleáris lokalizációs szignálja az (RXXX)_n motívum (n=7-8) része vagy egésze. Az argininek ilyen speciális rendezettségére nem találtunk példát más sejtmagi és nem sejtmagi fehérjékben.

A prion fehérje két nukleáris lokalizációs szignálja a pozitív aminosavak közül elsősorban lizineket tartalmaz, ehhez képest a hisztidin és arginin kisebb számban található meg. A prion fehérje extrém N-terminális nukleáris lokalizációs szignál szekvenciáját tekintve a klasszikus *monopartite* NLS-ek közé tartozik, ám az importin α -hoz történő kötődését még nem igazolták [29]. Eredményeink alapján arra a következtetésre jutottunk, hogy a GFP fúziós prion fehérje feltehetően aktív transzporttal jut a sejtmagba. A Shadoo fehérje nukleáris lokalizációs szignálja, amely feltehetően passzív transzportot közvetít, ezzel szemben argininekben gazdag. Érdekesség, hogy a Shadoo fehérje sejtmagi dúsulása aktív folyamat függő, hiszen az aktív folyamatok blokkolásával a Shadoo fehérje sejtmagi dúsulása megszűnt. Elképzelhető, hogy a Shadoo fehérje sejtmagi kötőpartnerre aktív folyamat révén jut a sejtmagba. Ez egy specifikus kölcsönhatásra utal, nem pedig a számos arginin jelenlétéhez köthető aspecifikus elektrosztatikus kölcsönhatásra bármilyen nukleinsavval.

Azt, hogy a Shadoo fehérje fúziós partner nélkül, fiziológias körülmények között mutat-e kettős lokalizációt, illetve hogy bekerül-e a sejtmagba, megfelelő, specifikus antitestek hiányában nehéz vizsgálni. Megvizsgáltuk a kereskedelmi forgalomban kapható összes antitestet, illetve megpróbáltunk készíttetni többféle antitestet is a Shadoo fehérje ellen. A különböző antitestekkel számos sejtvonalon láttunk sejtmagi festődést (sok esetben kizárólagos sejtmagi festődést), de az antitest-peptid kompetíciós kísérletek, illetve a YFP-Sho és Sho-YFP transzfektált sejteken és a Shadoo *knock out* egerek agyából készült metszeteken végzett immunfestéses kísérletek azt mutatták, hogy ezek az antitestek nem specifikusak és az ezen kísérletekből kapott eredmények nem értékelhetőek. David Westaway laboratóriumában is megpróbáltak Shadoo elleni ellenanyagok készítésével, amelyeket Shadoo *knock out* állatok agyából készült párhuzamos metszeteken ellenőriztek. Daude és munkatársai kimutatták ezen antitestekkel, hogy a várt plazmamembrán lokalizáció mellett az endogén Shadoo fehérje megfigyelhető a sejtmagi és/vagy citoszolikus kompartmentekben is egyes hipotalamikus neuronokban. Továbbá kimutatták az endogén Shadoo fehérjét a hiszton tartalmú sejtmag frakcióban vad típusú állatok agyából és sejtkultúrából is [76].

Corely és munkatársai azonosítottak a Shadoo fehérje N-terminálisán egy RGG-box motívumot, amely RNS-kötő fehérjékre jellemző. A Shadoo fehérje sejtmagfrakcióban történő előfordulása és nukleáris lokalizációja alapján párhuzamosan kutatócsoportunk és David Westaway kutatócsoportja is vizsgálta a Shadoo fehérje nukleinsav kötését. Úgy találtuk, hogy a Shadoo fehérje képes egy- és kétszálú nukleinsavak megkötésére *in vitro* körülmények között, és hogy ebben a kötésben az N-terminális régió argininjei fontos szerepet játszanak. Lau és munkatársai eredményeiket 2012-ben publikálták, a teljes N-terminális pozitív régiót vizsgálták, és a Shadoo fehérje nukleinsav kötését elsősorban az RGG-boxnak tulajdonították [69]. A mi eredményeink szerint az RGG-box nem elégséges sem a DNS, sem pedig az RNS kötéshez, a teljes N-terminális (RXXX)₈ motívum viszont egy- és kétszálú nukleinsavakat is képes kötni. Érdekes módon az (RXXX)₈ motívum második fele, az RGG-box hiányában is megtartotta részlegesen nukleinsav kötési képességét, illetve sejtmagi dúsulást közvetítő hatását. Ez ellent látszik mondani egy egyszerű, pusztán a pozitív aminosavak jelenlétéhez köthető magyarázatnak.

Mindezen eredményekből az látszik, hogy a Shadoo fehérje – hasonlóan a prion fehérjéhez – megfordulhat a sejtmagban fiziológias körülmények között is, ott asszociálódhat nukleinsavakhoz, vagy más sejtmagi komponensekhez. A Shadoo és prion fehérjék sejtmagi dúsulásának vizsgálatakor felfigyeltünk egy különbségre. A Shadoo fehérje dúsul a nukleoluszokban és feltehetően rendelkezik itt kötőpartnerrel, míg a prion fehérjénél azt tapasztaltuk, hogy kizáródik a nukleoluszokból. Ennek a különbségnek a magyarázata további kísérleteket igényel. A két fehérje NLS-e feltehetően más módon idézi elő a sejtmagi dúsulást (például aktív vagy passzív transzport, vagy kötőpartner tekintetében). Ez a különbség arra utalhat, hogy a két fehérje esetleges sejtmagi funkciója eltér.

Egyre több fehérjéről derül ki, hogy kettős lokalizációjú fehérje, ám az ehhez vezető transzport folyamatok, a szekréciós útvonalról történő kilépés helye és annak módja a legtöbb esetben mind a mai napig ismeretlen [127]. A szignálok általában nem tökéletes hatékonyságúak, ami eredményezhet a célállomástól eltérő lokalizációt, például szekréciós szignál esetén a plazmamembrán mellett a citoszolban, majd a sejtmagban megjelenő formát [128]. KDEL ER-retenciós szignállal vizsgáltuk a Shadoo fehérje szekréciós szignáljának hatékonyságát. A kotranszlációs transzlokáció során az ER-be kerülő fehérjék itt visszatartódnak, ám a szekréciós szignál nem tökéletes hatékonyságából származó, esetlegesen a citoszolban szintetizálódó és az ER-be nem bekerülő fehérjék sejtmagi dúsulása detektálható. Úgy találtuk, hogy a szintézis során esetlegesen a citoszolba és/vagy a sejtmagba

kerülő fúziós fehérje nem kimutatható mennyiségű. Emellett bizonyos fehérjéknél az ER-ből retrotranszlokációval történő kilépés eredményezhet citoszolikus és/vagy sejtmagi lokalizációt (például kalretikulin) [129]. Amennyiben a szekréciónál utvonál fehérjéinek eliminálása a citoszolból nem megfelelő hatékonyságú, úgy szintén a szekréciónál utvonaltól független lokalizációt kaphatunk [127]. Eredményeink alapján az ERAD elemek felhasználó retrotranszlokáció szintén nem eredményez detektálható mennyiségű citoszolikus fehérjét (Eeyarestatin I kezelés). A bemutatott kísérletekből lehet következtetni a szekréciónál utvonaltól történő kilépés helyére is. A KDEL ER-retenciós szignállal rendelkező fehérjék bekerülhetnek a COPII csomagolt ER transzport vezikulákba, ám a cisz-Golgi hálózattól retrográd transzporttal visszakerülnek az ER-be. Mivel a KDEL ER-retenciós szignál tartalmazó YFP-fúziós Shadoo fehérje esetében nem láttunk sejtmagi dúsulást, ezért a kilépés feltehetően a cisz-Golgi hálózat után történhet meg. Ezt támasztja alá a Brefeldin A kezelés is, amely fokozza az ER és a cisz-Golgi hálózat közötti retrográd transzportot és blokkolja az anterográd transzportot. Brefeldin A kezelés hatására sem tapasztaltunk sejtmagi dúsulást, amely egybevág a KDEL-es és RUSH-os kísérletekkel és egy másik oldalról támasztja alá azt, hogy a kilépés feltehetően a cisz-Golgi hálózat után található.

Az egyes fehérjék megfelelő rendeltetési helyre történő szétválogatása és irányítása a transz-Golgi hálózatban történik, így megfontolandó ennek a régióknak a vizsgálata, mint a szekréciónál utvonaltól történő kilépés helye. Elképzelhető, hogy a szekréciónál utvonál elhagyása valamilyen módosítást igényel. Például előfordulhat, hogy csak az érett fehérje vagy annak valamilyen módosított formája (proteolitikus fragmentum) léphet ki a szekréciónál utvonaltól. A szignálok, a GPI-horgony, a cukor oldalláncok illetve egyéb módosítások meglétét vagy hiányát a sejtmagi formán tervezzük vizsgálni. A szekréciónál utvonaltól történő rendeltetésszerű kilépés vizsgálata általános sejtbiológiai fontossággal is bír.

A prion fehérjének több különböző formája is megfigyelhető a sejtekben, melyeknek különböző funkciót tulajdonítanak [130,131]. Például a sejtek 2-5%-ában a prion fehérje transzmembrán formája figyelhető meg [132,133]. Ennek a formának a meglétét csak a prion fehérje overexpressziójával tudták bizonyítani [33,134], ám úgy találták, hogy ennek a formának a GPI-horgonyos formától eltérő biológiai funkciója van [131]. Rendezetlen fehérjékben ez a fajta különböző lokalizációkhoz kötött multifunkcionalitás feltehetően nem ritka jelenség [127,135,136,137]. Mivel a kompartmentalizáció nem 100%-os, ezért a Shadoo fehérje elkerülhetetlenül megjelenik a citoszolban és a sejtmagban. Azon eredményünk, miszerint a Shadoo fehérje rendelkezik nukleáris lokalizációs szignállal arra utal, hogy a

Shadoo fehérje sejtmagi lokalizációjával mindenképpen számolnunk kell még akkor is, ha ez a sejtmagi forma nem detektálható mennyiségben van jelen (lásd a prion fehérje transzmembrán formája).

Érdekes, hogy a prion és Shadoo fehérjék a hidrofób régió kivételével egyáltalán nem mutatnak szekvenciálisan azonosságot és mégis ettől a régiótól függetlenül találtunk további hasonló jellemzőket a két fehérje között. Mindkét fehérje bizonyos körülmények között megjelenik a sejtmagban, rendelkeznek nukleáris lokalizációs szignálokkal. Mindezek alapján feltételezhető, hogy a Shadoo és prion fehérjék bizonyos körülmények között a szekréciós útvonaltól függetlenül is megfigyelhetők és van valamilyen sejtmagi funkciójuk. Ezek mellé téve azt, hogy a doppel fehérje szekréciós szignál nélküli változata is képes dúsulni a sejtmagban – tehát feltehetően rendelkezik nukleáris lokalizációs szignállal –, elképzelhető, hogy a prion fehérjecsalád minden tagja kettős lokalizációjú fehérje és feltehetően rendelkeznek valamilyen sejtmagi funkcióval.

VI. ÖSSZEFOGLALÁS

- 1.) Kidolgoztunk és beállítottunk egy olyan klónozási módszert, mellyel több, klónozási munkák során gyakran felmerülő probléma elkerülhető. Ezen problémák megoldásához dublőr enzimek használatát javasoljuk. A megfelelő enzim gyors kiválasztásához és a primer tervezés megkönnyítéséhez készítettünk egy online elérhető programot.
- 2.) Megállapítottuk, hogy a YFP fúziós Shadoo fehérje – a prion fehérjéhez hasonlóan - kettős lokalizációt mutat, a várt plazmamembrán lokalizáció mellett megfigyelhető a sejtmagban és a sejtmagvacskában is.
- 3.) Azonosítottunk a Shadoo fehérje N-terminálisán egy a Shadoo fehérjékre karakterisztikus motívumot, amelyet az argininek szabályos, periodikus ismétlése jellemez [(RXXX)₈ motívum]. Deléciós és fúziós konstrukciókkal is megmutattuk, hogy (RXXX)₈ motívum része vagy egésze felelős a fúziós fehérje sejtmagi dúsulásáért. Megállapítottuk, hogy az (RXXX)₈ motívum argininjei feltehetően kulcsfontosságúak a dúsulás szempontjából.
- 4.) Kísérleteinkben azt tapasztaltuk, hogy az (RXXX)₈ motívum nem közvetít aktív transzportot.
- 5.) Eredményeink szerint a YFP fúziós Shadoo fehérje kötődik valamely komponenshez a sejtmagvacskában.
- 6.) Hűtéssel, illetve deoxy-glükóz kezeléssel is igazoltuk, hogy a Shadoo fehérje sejtmagi dúsulásához elengedhetetlen valamely energiát igénylő aktív folyamat működése.
- 7.) Fúziós fehérjékkel megmutattuk, hogy a prion fehérje feltehetően aktív transzporttal jut a sejtmagba, a sejtmagvacskából viszont – a Shadoo fehérjével ellentétben – kizáródik.
- 8.) Eredményeink szerint a Shadoo fehérje szekréciós útvonalon kívüli megjelenése és sejtmagi dúsulása nem a kotranszlációs transzlokáció elégtelen hatékonyságának következménye.
- 9.) Kísérleti eredményeink arra utalnak, hogy a Shadoo fehérje szekréciós útvonalról történő kilépése feltehetően az endoplazmatikus retikulum és a cisz-Golgi hálózat után következik be.
- 10.) A fehérje-nukleinsav kötés vizsgálatához kidolgoztuk és beállítottuk egy agaróz gélshift módszert, mellyel egyszerűen, radioaktív vagy karcinogén anyagok használata nélkül lehet detektálni fehérjék, illetve peptidek nukleinsavval való kölcsönhatását a komplex mobilitás változásán keresztül.

- 11.) Agaróz gélshift kísérleteink szerint a Shadoo fehérje, illetve az $(RXXX)_8$ motívum is képes egy- és kétszálú DNS oligonukleotid, illetve RNS megkötésére.

VII. SUMMARY

- 1.) Using the novel genetic engineering method developed in our laboratory can solve a few frequently arising problems during general cloning experiments. The use of Body Double Type IIS restriction endonucleases is recommended. To facilitate their use, we have provided an online, freely available Body Double enzyme finder and primer designer software.
- 2.) It has been established that the YFP fused variant of Shadoo protein is a dual localization protein, similarly to prion protein. The YFP fused variant of Shadoo protein can be detected in the plazma membrane, in the nucleus and in the nucleolus.
- 3.) We have identified a conserved motif at the N-terminal of Shadoo protein, which is characterized by periodically occurring arginins [(RXXX)₈ motif]. Using deletion and fusion constructs we have showed that the (RXXX)₈ motif is responsible for the nuclear targeting of Shadoo. The arginines of the (RXXX)₈ motif may play a key role in the nuclear enhancement of Shadoo protein.
- 4.) Our results suggest that the (RXXX)₈ motif of Shadoo does not mediate active transport through the nuclear pore complexes.
- 5.) The YFP-fused variant of Shadoo seems to bind an as-yet-unidentified binding partner in the nucleolus.
- 6.) The nuclear accumulation of Shadoo requires active processes.
- 7.) Using fusion constructs we have displayed that the prion protein enters the nucleus by active transport; however, in contrast to Shadoo protein, it is excluded from the nucleolii.
- 8.) Our data suggest that the secretory pathway independent appearance of Shadoo protein and its nuclear accumulation could not be explained by the ineffective cotranslational translocation into the ER lumen.
- 9.) The exit of Shadoo protein from the secretory pathway has been proved to occur after the endoplasmic reticulum and the cis-Golgi network.
- 10.) A non-radioactive and non-carcinogenic agarose gelshift assay was established for detection of the protein-nucleic acid binding based on the mobility changes of the complex.
- 11.) We have confirmed that the Shadoo protein and the (RXXX)₈ motif are able to bind single or double stranded DNA oligonucleotides and RNA molecules.

VIII. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton szeretnék köszönetet mondani témavezetőimnek, Dr. Welker Ervinnek és Dr. László Lajosnak. Irányításuk alatt megtanultam, hogy mit is jelent igazán kutatni, kérdéseket feltenni és azokat helyesen megválaszolni, kísérleteket kivitelezni, megfelelő kontrollokat alkalmazni és az eredményeket kiértékelni. Köszönöm útmutatásukat, türelmüket és támogatásukat, amellyel lehetővé tették, hogy munkám jó ütemben és megfelelő irányba haladjon. Külön köszönöm Dr. Welker Ervinnek, hogy biztosította munkámhoz a szükséges szakmai és anyagi háttérrel.

Hálás vagyok továbbá Kulcsár Péternek, első szakdolgozómnak, aki annak idején nagy lendülettel vetette bele magát a Shadoo NLS-ének meghatározásába, számos DNS konstrukciót készített és vizsgált sejtekben, munkájával nagyban hozzájárult ezen dolgozat létrejöttéhez. Közös munkánkat a Biológus Tudományos Diákköri Konferencián poszter formájában is bemutatta, amellyel negyedik helyezést ért el, illetve jeles érdemjegyű, színvonalas szakdolgozatában is prezentálta.

Köszönettel tartozom Vodicska Barbarának, akivel együtt dolgoztunk a Shadoo fehérje útvonalának meghatározásán, illetve Dr. Major Balázsnak, Dr. Borsy Adriennek és Vida Istvánnak, akikkel együtt vizsgáltuk a Shadoo fehérje nukleinsav kötését. Dr. Borsy Adrienn és Vida István készítették a legtöbb bakteriális expressziós konstrukciót a Shadoo fehérje nukleinsav kötésének vizsgálatához, munkájukat ezúton is köszönöm. Szeretném megköszönni Welker Zsombornak a dublör enzimek használatát megkönnyítő primer tervező program elkészítését és Kulcsár Péternek az adatbázisok összeállításában nyújtott segítségét. Köszönettel tartozom Dr. Orsolits Barbarának a Shadoo ellenanyagok Shadoo fehérje *knock out* állatok agyából készült metszeteken történő teszteléséért.

Köszönettel tartozom Nyeste Antalnak, hogy bevezetett a molekuláris klónozás rejtjelmeibe, Antalffy Gézának a konfokális mikroszkóp használatának megtanításáért. Rengeteget tanultam továbbá Kiss Judittól a sejt kultúrák fenntartásáról, Huszár Krisztinától és Kucsma Nóráról a Western blot kivitelezéséről, Dr. Major Balázstól a bakteriális fehérje expresszióról és tisztításról.

Szeretném megköszönni Dr. Ayaydin-Fodor Elfriedának és Dr. Ayaydin Ferhannak a korai kísérletek kivitelezésében nyújtott segítségüket, Dr. Kalmár Lajosnak a bioinformatikai

analízis elvégzését, Baunoch Juditnak a precíz és kitartó munkáját a számtalan sejtvonalam fenntartásában, továbbá a Homolya-, Orbán-, Szakács-, Váradi-, Sarkadi- és Vértessy-csoport rengeteg segítségét, bármikor fordulhattam hozzájuk kérésekkel, kérdésekkel.

Ezúton szeretném ismételten megköszönni Yurij Lazebnik-nek, hogy rendelkezésünkre bocsátotta a GFP- β -Galaktozidáz és az NLS-GFP- β -Galaktozidáz DNS konstrukciókat, Yong-Sun Kim-nek és Takashi Onodera-nak a Zpl2-1, Zw3-5, Hpl3-4, Hw13-3 sejtvonalak létrehozását és elküldését.

Hálásan köszönöm Dr. Welker Ervinnek, Dr. László Lajosnak, Dr. Monostory Katalinnak, Dr. Balogh Balázsnak, Dr. Orsolits Barbarának, Dr. Kalmár Lajosnak, Vodicska Barbarának és Vida Istvánnak hogy türelmesen és körültekintően átolvasták a dolgozatomat, és észrevételeikkel segítették és emelték a dolgozat színvonalát.

Köszönettel tartozom az Eötvös Loránd Tudományegyetem Biológia doktori iskolájának és Prof. Dr. Sass Miklósnak a támogatásért doktori éveim során.

Szeretném megköszönni a doktori évek során nyújtott támogatását a Magyar Fejlesztési Banknak (Habilis ösztöndíj, 2010-2011), a Richter Gedeon Centenárium Alapítványnak (Rövidtávú kutatási támogatás, 2011, 2012, 2013) és a Közigazgatási és Igazságügyi Hivatalnak (Jedlik Ányos Doktorjelölt Ösztöndíj, Nemzeti Kiválóság Program, TÁMOP 4.2.4. A/2-11-1-2012-0001, 2013-2014). Az elnyert ösztöndíjak és konferencia támogatások nagyban hozzájárultak a munka létrejöttéhez és prezentálásához.

Végezetül, de nem utolsó sorban szeretném megköszönni a segítséget, támogatást és a biztatást a Fehérje Konformációs Betegségek csoport minden volt és jelenlegi munkatársának.

IX. IRODALOMJEGYZÉK

1. Aguzzi A, Baumann F, Bremer J (2008) The prion's elusive reason for being. *Annu Rev Neurosci* 31: 439-477.
2. Collinge J (2001) Prion diseases of humans and animals: their causes and molecular basis. *Annu Rev Neurosci* 24: 519-550.
3. Prusiner SB (1998) Prions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 13363-13383.
4. Caughey B, Lansbury PT (2003) Protofibrils, pores, fibrils, and neurodegeneration: separating the responsible protein aggregates from the innocent bystanders. *Annu Rev Neurosci* 26: 267-298.
5. Sigurdsson B (1954) Rida, a chronic encephalitis of sheep: With general remarks on infections which develop slowly and some of their special characteristics. *Br Vet J* 110: 341-354.
6. Hadlow W (1959) Scrapie and kuru. *Lancet* ii: 289-290.
7. Gajdusek DC, Gibbs CJ, Alpers M (1966) Experimental transmission of a Kuru-like syndrome to chimpanzees. *Nature* 209: 794-796.
8. Gibbs CJ, Jr., Gajdusek DC, Asher DM, Alpers MP, Beck E, et al. (1968) Creutzfeldt-Jakob disease (spongiform encephalopathy): transmission to the chimpanzee. *Science* 161: 388-389.
9. Prusiner SB (1982) Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science* 216: 136-144.
10. Brown P, Bradley R (1998) 1755 and all that: a historical primer of transmissible spongiform encephalopathy. *BMJ* 317: 1688-1692.
11. Oesch B, Westaway D, Walchli M, McKinley MP, Kent SB, et al. (1985) A cellular gene encodes scrapie PrP 27-30 protein. *Cell* 40: 735-746.
12. Watts JC, Westaway D (2007) The prion protein family: diversity, rivalry, and dysfunction. *Biochim Biophys Acta* 1772: 654-672.
13. Fournier JG (2001) Nonneuronal cellular prion protein. *Int Rev Cytol* 208: 121-160.
14. Harris DA (1999) Cellular biology of prion diseases. *Clin Microbiol Rev* 12: 429-444.
15. Chakrabarti O, Ashok A, Hegde RS (2009) Prion protein biosynthesis and its emerging role in neurodegeneration. *Trends Biochem Sci* 34: 287-295.
16. Moran P, Raab H, Kohr WJ, Caras IW (1991) Glycophospholipid membrane anchor attachment. Molecular analysis of the cleavage/attachment site. *J Biol Chem* 266: 1250-1257.
17. Eisenhaber B, Bork P, Eisenhaber F (1998) Sequence properties of GPI-anchored proteins near the omega-site: constraints for the polypeptide binding site of the putative transamidase. *Protein Eng* 11: 1155-1161.
18. Haraguchi T, Fisher S, Olofsson S, Endo T, Groth D, et al. (1989) Asparagine-linked glycosylation of the scrapie and cellular prion proteins. *Arch Biochem Biophys* 274: 1-13.
19. Lehmann S, Harris DA (1997) Blockade of glycosylation promotes acquisition of scrapie-like properties by the prion protein in cultured cells. *J Biol Chem* 272: 21479-21487.
20. Rudd PM, Wormald MR, Wing DR, Prusiner SB, Dwek RA (2001) Prion glycoprotein: structure, dynamics, and roles for the sugars. *Biochemistry* 40: 3759-3766.
21. Sarnataro D, Campana V, Paladino S, Stornaiuolo M, Nitsch L, et al. (2004) PrP(C) association with lipid rafts in the early secretory pathway stabilizes its cellular conformation. *Mol Biol Cell* 15: 4031-4042.
22. Borchelt DR, Scott M, Taraboulos A, Stahl N, Prusiner SB (1990) Scrapie and cellular prion proteins differ in their kinetics of synthesis and topology in cultured cells. *J Cell Biol* 110: 743-752.
23. Caughey B, Race RE, Ernst D, Buchmeier MJ, Chesebro B (1989) Prion protein biosynthesis in scrapie-infected and uninfected neuroblastoma cells. *J Virol* 63: 175-181.
24. Colacino S, Tiana G, Colombo G (2006) Similar folds with different stabilization mechanisms: the cases of Prion and Doppel proteins. *BMC Struct Biol* 6: 17.

25. Oglecka K, Lundberg P, Magzoub M, Goran Eriksson LE, Langel U, et al. (2008) Relevance of the N-terminal NLS-like sequence of the prion protein for membrane perturbation effects. *Biochim Biophys Acta* 1778: 206-213.
26. Hornshaw MP, McDermott JR, Candy JM (1995) Copper binding to the N-terminal tandem repeat regions of mammalian and avian prion protein. *Biochem Biophys Res Commun* 207: 621-629.
27. Brown DR, Qin K, Herms JW, Madlung A, Manson J, et al. (1997) The cellular prion protein binds copper in vivo. *Nature* 390: 684-687.
28. Kong Q, Surewicz KA, Petersen RB, Zou W, Chen SG, et al. (2004) *Prion Biology and Diseases*. Cold Spring Harbor Laboratory Press 41: pp. 673-775.
29. Gu Y, Hinnerwisch J, Fredricks R, Kalepu S, Mishra RS, et al. (2003) Identification of cryptic nuclear localization signals in the prion protein. *Neurobiol Dis* 12: 133-149.
30. Watts JC, Drisaldi B, Ng V, Yang J, Strome B, et al. (2007) The CNS glycoprotein Shadoo has PrP(C)-like protective properties and displays reduced levels in prion infections. *EMBO J* 26: 4038-4050.
31. Aguzzi A, Sigurdson C, Heikenwaelder M (2008) Molecular mechanisms of prion pathogenesis. *Annu Rev Pathol* 3: 11-40.
32. Pan KM, Baldwin M, Nguyen J, Gasset M, Serban A, et al. (1993) Conversion of alpha-helices into beta-sheets features in the formation of the scrapie prion proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 10962-10966.
33. Hegde RS, Mastrianni JA, Scott MR, DeFea KA, Tremblay P, et al. (1998) A transmembrane form of the prion protein in neurodegenerative disease. *Science* 279: 827-834.
34. Lund C, Olsen CM, Skogtvedt S, Tveit H, Prydz K, et al. (2009) Alternative translation initiation generates cytoplasmic sheep prion protein. *J Biol Chem* 284: 19668-19678.
35. Juanes ME, Elvira G, Garcia-Grande A, Calero M, Gasset M (2009) Biosynthesis of prion protein nucleocytoplasmic isoforms by alternative initiation of translation. *J Biol Chem* 284: 2787-2794.
36. Borchelt DR, Rogers M, Stahl N, Telling G, Prusiner SB (1993) Release of the cellular prion protein from cultured cells after loss of its glycoinositol phospholipid anchor. *Glycobiology* 3: 319-329.
37. Harris DA, Huber MT, van Dijken P, Shyng SL, Chait BT, et al. (1993) Processing of a cellular prion protein: identification of N- and C-terminal cleavage sites. *Biochemistry* 32: 1009-1016.
38. Parkin ET, Watt NT, Turner AJ, Hooper NM (2004) Dual mechanisms for shedding of the cellular prion protein. *J Biol Chem* 279: 11170-11178.
39. Chen SG, Teplow DB, Parchi P, Teller JK, Gambetti P, et al. (1995) Truncated forms of the human prion protein in normal brain and in prion diseases. *J Biol Chem* 270: 19173-19180.
40. Mange A, Beranger F, Peoc'h K, Onodera T, Frobert Y, et al. (2004) Alpha- and beta- cleavages of the amino-terminus of the cellular prion protein. *Biol Cell* 96: 125-132.
41. Endres K, Mitteregger G, Kojro E, Kretzschmar H, Fahrenholz F (2009) Influence of ADAM10 on prion protein processing and scrapie infectivity in vivo. *Neurobiol Dis* 36: 233-241.
42. Altmeppen HC, Prox J, Puig B, Kluth MA, Bernreuther C, et al. (2011) Lack of a-disintegrin-and-metalloproteinase ADAM10 leads to intracellular accumulation and loss of shedding of the cellular prion protein in vivo. *Mol Neurodegener* 6: 36.
43. Brown DR (2003) Prion protein expression modulates neuronal copper content. *J Neurochem* 87: 377-385.
44. Li A, Harris DA (2005) Mammalian prion protein suppresses Bax-induced cell death in yeast. *J Biol Chem* 280: 17430-17434.
45. Roucou X, Gains M, LeBlanc AC (2004) Neuroprotective functions of prion protein. *J Neurosci Res* 75: 153-161.
46. Drisaldi B, Coomaraswamy J, Mastrangelo P, Strome B, Yang J, et al. (2004) Genetic mapping of activity determinants within cellular prion proteins: N-terminal modules in PrP(C) offset pro-apoptotic activity of the Doppel helix B/B' region. *J Biol Chem* 279: 55443-55454.

47. Westergard L, Christensen HM, Harris DA (2007) The cellular prion protein (PrP(C)): its physiological function and role in disease. *Biochim Biophys Acta* 1772: 629-644.
48. Zomosa-Signoret V, Arnaud JD, Fontes P, Alvarez-Martinez MT, Liautard JP (2008) Physiological role of the cellular prion protein. *Vet Res* 39: 9.
49. Barmada S, Piccardo P, Yamaguchi K, Ghetti B, Harris DA (2004) GFP-tagged prion protein is correctly localized and functionally active in the brains of transgenic mice. *Neurobiol Dis* 16: 527-537.
50. Pfeifer K, Bachmann M, Schroder HC, Forrest J, Muller WE (1993) Kinetics of expression of prion protein in uninfected and scrapie-infected N2a mouse neuroblastoma cells. *Cell Biochem Funct* 11: 1-11.
51. Lorenz H, Windl O, Kretzschmar HA (2002) Cellular phenotyping of secretory and nuclear prion proteins associated with inherited prion diseases. *J Biol Chem* 277: 8508-8516.
52. Morel E, Fouquet S, Strup-Perrot C, Pichol Thievent C, Petit C, et al. (2008) The cellular prion protein PrP(c) is involved in the proliferation of epithelial cells and in the distribution of junction-associated proteins. *PLoS One* 3: e3000.
53. Jaegly A, Mouthon F, Peyrin JM, Camugli B, Deslys JP, et al. (1998) Search for a nuclear localization signal in the prion protein. *Mol Cell Neurosci* 11: 127-133.
54. Crozet C, Vezilier J, Delfieu V, Nishimura T, Onodera T, et al. (2006) The truncated 23-230 form of the prion protein localizes to the nuclei of inducible cell lines independently of its nuclear localization signals and is not cytotoxic. *Mol Cell Neurosci* 32: 315-323.
55. Sakaguchi S, Katamine S, Nishida N, Moriuchi R, Shigematsu K, et al. (1996) Loss of cerebellar Purkinje cells in aged mice homozygous for a disrupted PrP gene. *Nature* 380: 528-531.
56. Moore RC, Lee IY, Silverman GL, Harrison PM, Strome R, et al. (1999) Ataxia in prion protein (PrP)-deficient mice is associated with upregulation of the novel PrP-like protein doppel. *J Mol Biol* 292: 797-817.
57. Peoc'h K, Serres C, Frobert Y, Martin C, Lehmann S, et al. (2002) The human "prion-like" protein Doppel is expressed in both Sertoli cells and spermatozoa. *J Biol Chem* 277: 43071-43078.
58. Shaked Y, Hijazi N, Gabizon R (2002) Doppel and PrP(C) do not share the same membrane microenvironment. *FEBS Lett* 530: 85-88.
59. Behrens A, Genoud N, Naumann H, Rulicke T, Janett F, et al. (2002) Absence of the prion protein homologue Doppel causes male sterility. *EMBO J* 21: 3652-3658.
60. Paisley D, Banks S, Selfridge J, McLennan NF, Ritchie AM, et al. (2004) Male infertility and DNA damage in Doppel knockout and prion protein/Doppel double-knockout mice. *Am J Pathol* 164: 2279-2288.
61. Golanska E, Flirski M, Liberski PP (2004) Doppel: the prion's double. *Folia Neuropathologica Suppl. A*: pp. 47-54.
62. Mo H, Moore RC, Cohen FE, Westaway D, Prusiner SB, et al. (2001) Two different neurodegenerative diseases caused by proteins with similar structures. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 2352-2357.
63. Luhrs T, Riek R, Guntert P, Wuthrich K (2003) NMR structure of the human doppel protein. *J Mol Biol* 326: 1549-1557.
64. Silverman GL, Qin K, Moore RC, Yang Y, Mastrangelo P, et al. (2000) Doppel is an N-glycosylated, glycosylphosphatidylinositol-anchored protein. Expression in testis and ectopic production in the brains of Prnp(0/0) mice predisposed to Purkinje cell loss. *J Biol Chem* 275: 26834-26841.
65. Premzl M, Sangiorgio L, Strumbo B, Marshall Graves JA, Simonic T, et al. (2003) Shadoo, a new protein highly conserved from fish to mammals and with similarity to prion protein. *Gene* 314: 89-102.
66. Daude N, Westaway D (2011) Biological properties of the PrP-like Shadoo protein. *Front Biosci* 16: 1505-1516.
67. Miesbauer M, Bamme T, Riemer C, Oidtmann B, Winklhofer KF, et al. (2006) Prion protein-related proteins from zebrafish are complex glycosylated and contain a glycosylphosphatidylinositol anchor. *Biochem Biophys Res Commun* 341: 218-224.

68. Corley SM, Gready JE (2008) Identification of the RGG box motif in Shadoo: RNA-binding and signaling roles? *Bioinform Biol Insights* 2: 383-400.
69. Lau A, Mays CE, Genovesi S, Westaway D (2012) RGG Repeats of PrP-like Shadoo Protein Bind Nucleic Acids. *Biochemistry*.
70. Lampo E, Van Poucke M, Hugot K, Hayes H, Van Zeveren A, et al. (2007) Characterization of the genomic region containing the Shadow of Prion Protein (SPRN) gene in sheep. *BMC Genomics* 8: 138.
71. Ubaldi C, Paulis M, Guidi E, Bertoni A, Meo GP, et al. (2006) Cloning of the bovine prion-like Shadoo (SPRN) gene by comparative analysis of the predicted genomic locus. *Mamm Genome* 17: 1130-1139.
72. Daude N, Ng V, Watts JC, Genovesi S, Graves JP, et al. (2010) Wild-type Shadoo proteins convert to amyloid-like forms under native conditions. *J Neurochem* 113: 92-104.
73. Young R, Passet B, Vilotte M, Cribiu EP, Beringue V, et al. (2009) The prion or the related Shadoo protein is required for early mouse embryogenesis. *FEBS Lett* 583: 3296-3300.
74. Passet B, Young R, Makhzami S, Vilotte M, Jaffrezic F, et al. (2012) Prion protein and shadoo are involved in overlapping embryonic pathways and trophoblastic development. *PLoS One* 7: e41959.
75. Daude N, Westaway D (2012) Shadoo/PrP (Sprn (0/0) /Prnp (0/0)) double knockout mice: More than zeroes. *Prion* 6.
76. Daude N, Wohlgemuth S, Brown R, Pitstick R, Gapeschina H, et al. (2012) Knockout of the prion protein (PrP)-like Sprn gene does not produce embryonic lethality in combination with PrP(C)-deficiency. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109: 9035-9040.
77. Leslie M (2005) Lost in translation: the signal hypothesis. *J Cell Biol* 170: 338.
78. Blobel G (2000) Protein targeting (Nobel lecture). *Chembiochem* 1: 86-102.
79. von Heijne G (1985) Signal sequences. The limits of variation. *J Mol Biol* 184: 99-105.
80. Hebert DN, Molinari M (2007) In and out of the ER: protein folding, quality control, degradation, and related human diseases. *Physiol Rev* 87: 1377-1408.
81. Lodish H, Berk A, Kaiser CA, Krieger M, Scott MP, et al. (2008) *Molecular cell biology* (sixth edition). Book.
82. Legate KR, Falcone D, Andrews DW (2000) Nucleotide-dependent binding of the GTPase domain of the signal recognition particle receptor beta-subunit to the alpha-subunit. *J Biol Chem* 275: 27439-27446.
83. Laszlo L, Csikós G, Sass M, Lőw P (2012) *Molekuláris biológia*. e-book.
84. Zimmermann R, Eyrich S, Ahmad M, Helms V (2011) Protein translocation across the ER membrane. *Biochim Biophys Acta* 1808: 912-924.
85. Ruggiano A, Foresti O, Carvalho P (2014) Quality control: ER-associated degradation: protein quality control and beyond. *J Cell Biol* 204: 869-879.
86. Gillon AD, Latham CF, Miller EA (2012) Vesicle-mediated ER export of proteins and lipids. *Biochim Biophys Acta* 1821: 1040-1049.
87. Jackson CL (2009) Mechanisms of transport through the Golgi complex. *J Cell Sci* 122: 443-452.
88. Rodriguez-Boulán E, Musch A (2005) Protein sorting in the Golgi complex: shifting paradigms. *Biochim Biophys Acta* 1744: 455-464.
89. Luini A, Mironov AA, Polishchuk EV, Polishchuk RS (2008) Morphogenesis of post-Golgi transport carriers. *Histochem Cell Biol* 129: 153-161.
90. Silverman JM, Reiner NE (2011) Exosomes and other microvesicles in infection biology: organelles with unanticipated phenotypes. *Cell Microbiol* 13: 1-9.
91. Ding Q, Zhao L, Guo H, Zheng AC (2010) The nucleocytoplasmic transport of viral proteins. *Virol Sin* 25: 79-85.
92. Guttler T, Gorlich D (2011) Ran-dependent nuclear export mediators: a structural perspective. *EMBO J* 30: 3457-3474.
93. Debler EW, Hsia KC, Nagy V, Seo HS, Hoelz A (2010) Characterization of the membrane-coating Nup84 complex: paradigm for the nuclear pore complex structure. *Nucleus* 1: 150-157.

94. Hoelz A, Debler EW, Blobel G (2011) The structure of the nuclear pore complex. *Annu Rev Biochem* 80: 613-643.
95. Christophe D, Christophe-Hobertus C, Pichon B (2000) Nuclear targeting of proteins: how many different signals? *Cell Signal* 12: 337-341.
96. Lee BJ, Cansizoglu AE, Suel KE, Louis TH, Zhang Z, et al. (2006) Rules for nuclear localization sequence recognition by karyopherin beta 2. *Cell* 126: 543-558.
97. Quimby BB, Corbett AH (2001) Nuclear transport mechanisms. *Cell Mol Life Sci* 58: 1766-1773.
98. Sorokin AV, Kim ER, Ovchinnikov LP (2007) Nucleocytoplasmic transport of proteins. *Biochemistry (Mosc)* 72: 1439-1457.
99. Faleiro L, Lazebnik Y (2000) Caspases disrupt the nuclear-cytoplasmic barrier. *J Cell Biol* 151: 951-959.
100. Roberts RJ, Vincze T, Posfai J, Macelis D (2010) REBASE--a database for DNA restriction and modification: enzymes, genes and genomes. *Nucleic Acids Res* 38: D234-236.
101. Kim BH, Kim JI, Choi EK, Carp RI, Kim YS (2005) A neuronal cell line that does not express either prion or doppel proteins. *Neuroreport* 16: 425-429.
102. Kuwahara C, Takeuchi AM, Nishimura T, Haraguchi K, Kubosaki A, et al. (1999) Prions prevent neuronal cell-line death. *Nature* 400: 225-226.
103. Chatterjee S, Stochaj U (1998) Diffusion of proteins across the nuclear envelope of HeLa cells. *Biotechniques* 24: 668-674.
104. Sievers F, Wilm A, Dineen D, Gibson TJ, Karplus K, et al. (2011) Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Mol Syst Biol* 7: 539.
105. Waterhouse AM, Procter JB, Martin DM, Clamp M, Barton GJ (2009) Jalview Version 2--a multiple sequence alignment editor and analysis workbench. *Bioinformatics* 25: 1189-1191.
106. Crooks GE, Hon G, Chandonia JM, Brenner SE (2004) WebLogo: a sequence logo generator. *Genome Res* 14: 1188-1190.
107. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215: 403-410.
108. Eddy SR (2011) Accelerated Profile HMM Searches. *PLoS Comput Biol* 7: e1002195.
109. Cokol M, Nair R, Rost B (2000) Finding nuclear localization signals. *EMBO Rep* 1: 411-415.
110. Dono R, James D, Zeller R (1998) A GR-motif functions in nuclear accumulation of the large FGF-2 isoforms and interferes with mitogenic signalling. *Oncogene* 16: 2151-2158.
111. Nguyen Ba AN, Pogoutse A, Provart N, Moses AM (2009) NLStradamus: a simple Hidden Markov Model for nuclear localization signal prediction. *BMC Bioinformatics* 10: 202.
112. Nakai K, Horton P (1999) PSORT: a program for detecting sorting signals in proteins and predicting their subcellular localization. *Trends Biochem Sci* 24: 34-36.
113. Sigrist CJ, Cerutti L, Hulo N, Gattiker A, Falquet L, et al. (2002) PROSITE: a documented database using patterns and profiles as motif descriptors. *Brief Bioinform* 3: 265-274.
114. Lange A, Mills RE, Lange CJ, Stewart M, Devine SE, et al. (2007) Classical nuclear localization signals: definition, function, and interaction with importin alpha. *J Biol Chem* 282: 5101-5105.
115. Lange A, McLane LM, Mills RE, Devine SE, Corbett AH (2010) Expanding the definition of the classical bipartite nuclear localization signal. *Traffic* 11: 311-323.
116. Ghaffari M, Zeng X, Whitsett JA, Yan C (1997) Nuclear localization domain of thyroid transcription factor-1 in respiratory epithelial cells. *Biochem J* 328 (Pt 3): 757-761.
117. Christophe-Hobertus C, Duquesne V, Pichon B, Roger PP, Christophe D (1999) Critical residues of the homeodomain involved in contacting DNA bases also specify the nuclear accumulation of thyroid transcription factor-1. *Eur J Biochem* 265: 491-497.
118. Wu J, Zhou L, Tonissen K, Tee R, Artzt K (1999) The quaking I-5 protein (QKI-5) has a novel nuclear localization signal and shuttles between the nucleus and the cytoplasm. *J Biol Chem* 274: 29202-29210.
119. Nigg EA (1997) Nucleocytoplasmic transport: signals, mechanisms and regulation. *Nature* 386: 779-787.

120. Mays CE, Coomaraswamy J, Watts JC, Yang J, Ko KW, et al. (2014) Endoproteolytic processing of the mammalian prion glycoprotein family. *FEBS J* 281: 862-876.
121. Vodicska B (2014) Egy membránfehérje a sejtmagban. MSc szakdolgozat.
122. Misumi Y, Miki K, Takatsuki A, Tamura G, Ikehara Y (1986) Novel blockade by brefeldin A of intracellular transport of secretory proteins in cultured rat hepatocytes. *J Biol Chem* 261: 11398-11403.
123. Boncompain G, Divoux S, Gareil N, de Forges H, Lescure A, et al. (2012) Synchronization of secretory protein traffic in populations of cells. *Nat Methods* 9: 493-498.
124. Wang Q, Li L, Ye Y (2008) Inhibition of p97-dependent protein degradation by Eeyarestatin I. *J Biol Chem* 283: 7445-7454.
125. Wang Q, Shinkre BA, Lee JG, Weniger MA, Liu Y, et al. (2010) The ERAD inhibitor Eeyarestatin I is a bifunctional compound with a membrane-binding domain and a p97/VCP inhibitory group. *PLoS One* 5: e15479.
126. Vida I (2013) A prion fehérjék családjába tartozó Shadoo fehérje nukleinsav kötésének vizsgálata agaróz gél shift módszerrel. MSc szakdolgozat.
127. Arnoys EJ, Wang JL (2007) Dual localization: proteins in extracellular and intracellular compartments. *Acta Histochem* 109: 89-110.
128. Levine CG, Mitra D, Sharma A, Smith CL, Hegde RS (2005) The efficiency of protein compartmentalization into the secretory pathway. *Mol Biol Cell* 16: 279-291.
129. Afshar N, Black BE, Paschal BM (2005) Retrotranslocation of the chaperone calreticulin from the endoplasmic reticulum lumen to the cytosol. *Mol Cell Biol* 25: 8844-8853.
130. Strom A, Wang GS, Picketts DJ, Reimer R, Stuke AW, et al. (2011) Cellular prion protein localizes to the nucleus of endocrine and neuronal cells and interacts with structural chromatin components. *Eur J Cell Biol* 90: 414-419.
131. Gibbings D, Leblanc P, Jay F, Pontier D, Michel F, et al. (2012) Human prion protein binds Argonaute and promotes accumulation of microRNA effector complexes. *Nat Struct Mol Biol* 19: 517-524, S511.
132. Rane NS, Chakrabarti O, Feigenbaum L, Hegde RS (2010) Signal sequence insufficiency contributes to neurodegeneration caused by transmembrane prion protein. *J Cell Biol* 188: 515-526.
133. Emerman AB, Zhang ZR, Chakrabarti O, Hegde RS (2010) Compartment-restricted biotinylation reveals novel features of prion protein metabolism in vivo. *Mol Biol Cell* 21: 4325-4337.
134. Yost CS, Lopez CD, Prusiner SB, Myers RM, Lingappa VR (1990) Non-hydrophobic extracytoplasmic determinant of stop transfer in the prion protein. *Nature* 343: 669-672.
135. Villamil Giraldo AM, Lopez Medus M, Gonzalez Lebrero M, Pagano RS, Labriola CA, et al. (2010) The structure of calreticulin C-terminal domain is modulated by physiological variations of calcium concentration. *J Biol Chem* 285: 4544-4553.
136. Wijeyesakere SJ, Gafni AA, Raghavan M (2011) Calreticulin is a thermostable protein with distinct structural responses to different divalent cation environments. *J Biol Chem* 286: 8771-8785.
137. Babu MM, van der Lee R, de Groot NS, Gsponer J (2011) Intrinsically disordered proteins: regulation and disease. *Curr Opin Struct Biol* 21: 432-440.

X. FÜGGELÉK

DNS konstrukció neve	Kiindulási konstrukció neve	Primer 1	Primer 2	Klónozási technika
YFP-Sho	pEYFP-C1	AAGGGCTAGCCACCATG AACTGGACTGCTGCCAC G	GGGGGGACCGGTAAGGC GCTACAGCTGTCA	PCR
		GGCGCGGAATTCTAAGG GCGGCCGCGGAGGC	CGCGCCGGATCCTCATC CCACGATCAGGAAGATG	PCR
		CCGGTCGCGCATTTGGT GAGCAAGGG AGAG	CTCTCCCTTGCTCACCAA ATGCGCGACCGG	mutagenézis
Sho-YFP	YFP-GPI	AAGGGCTAGCCACCATG AACTGGACTGCTG	CCCCGACCGGTAAGGA AGTCCAGGCCAG	PCR
YFP-GPI	YFP-Sho	CGAGCTCAAGCTTCGAA TTCTGGCTCAGGGTCCG TGCACAGC	GCTGTGCACGGACCCTG AGCCAGAATTCGAAGCT TGAGCTCG	mutagenézis
Δ SS-YFP-Sho	YFP-Sho	GTCAGATCCGCTAGCCA CCATGGTGAGCAAGGGC GAGG	CCTCGCCCTTGCTCACC ATGGTGGCATGCGGATC TGAC	mutagenézis
Δ SS-Sho-YFP	Sho-YFP	GATCAGCTAGCCACCAT GAAGGGAGGACGCGGA GGC	GCCTCCGCGTCCTCCCTT CATGGTGGCTAGCTGAT C	mutagenézis
Δ SS -YFP-Dpl	Δ SS-YFP-Sho	Δ SS-YFP-Sho és YFP-Dpl vektorok EcoRI és BamHI emésztése		
GFP-NLS ^{ttfl}	pEGFP-C1	AATTCACGTAGGAAGCG CCGGTAAG	GATCCTTACCGGCGCTT CCTACGTG	linker inszert
GFP-NLS ^{qki5}	pEGFP-C1	AATTCCCGTGTCCATCC ATACCAAAGGTAGG	GATCCCTACCTTTGGTAT GGATGGACACGGG	linker inszert
GFP-NLS ^{x1SV40}	pEGFP-C1	AATTCTCAAAAAAAGAA ACGAAAAGTATAAG	GATCCTTATACTTTTCGT TTCTTTTTTGGAG	linker inszert
YFP-Sho ^{ΔSNLS}	YFP-Sho	ATTCTAAGGGAGGCGTG CGCGGAGGTGC	GCACCTCCGCGCACGCC TCCCTTAGAAT	mutagenézis
YFP-Sho ^{ARGG}	YFP-Sho	TTCTAAGGGCGGCGCAC GAGGGGCATC	GATGCCCTCGTGCGCC GCCCTTAGAA	mutagenézis

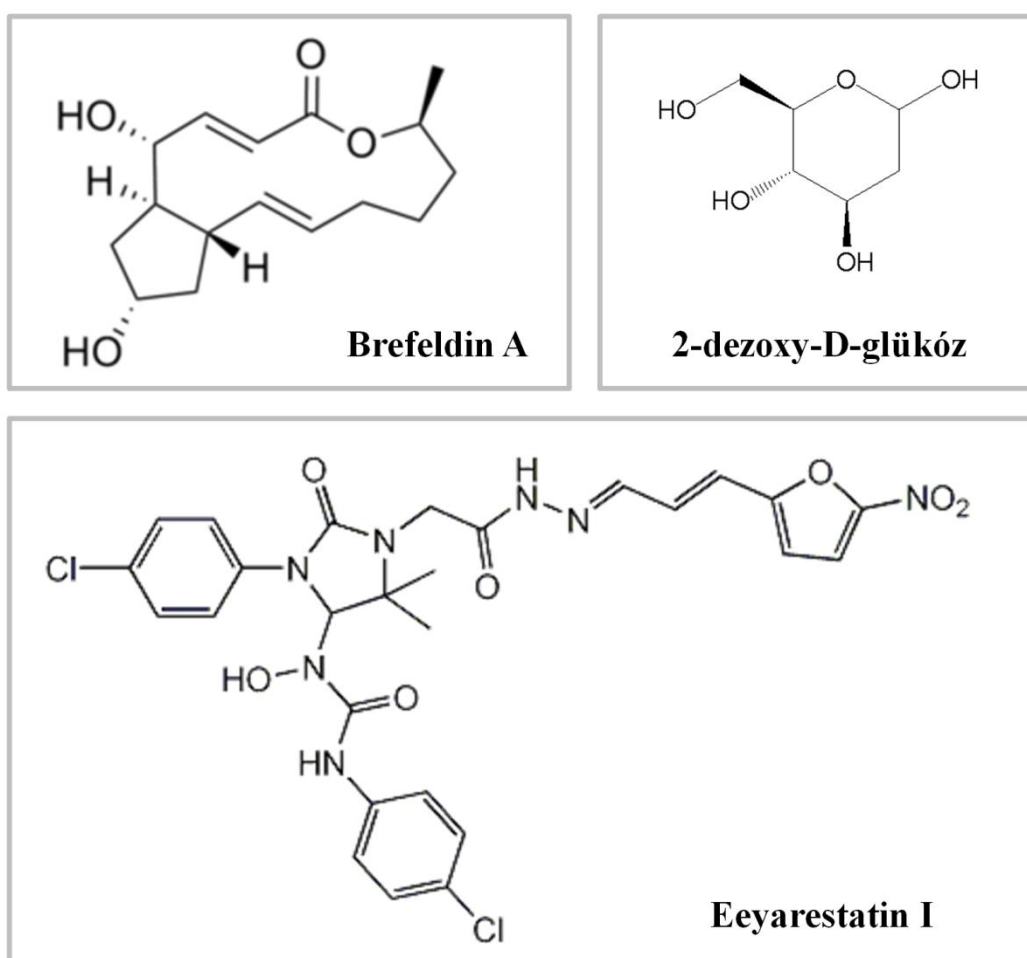
YFP-Sho^{Δ(RXXX)8}	YFP-Sho	CAAGCTTCGAATTCTGT GGCGGCTGCAGGG	CCCTGCAGCCGCCACAG AATTCGAAGCTTG	mutagenesis
ΔSS-YFP-Sho^{ΔsNLS}	ΔSS-YFP-Sho	ATTCTAAGGGAGGCGTG CGCGGAGGTGC	GCACCTCCGCGCACGCC TCCCTTAGAAT	mutagenesis
ΔSS-YFP-Sho^{ΔRGG}	ΔSS-YFP-Sho	TTCTAAGGGCGGCGCAC GAGGGGCATC	GATGCCCCCTCGTGCGCC GCCCTTAGAA	mutagenesis
ΔSS-YFP-Sho^{Δ(RXXX)8}	ΔSS-YFP-Sho	CAAGCTTCGAATTCTGT GGCGGCTGCAGGG	CCCTGCAGCCGCCACAG AATTCGAAGCTTG	mutagenesis
ΔSS-Sho^{ΔsNLS}-YFP	ΔSS-Sho-YFP	GGGGGGGCTAGCAACCA TGAAGGGAGGCGTGCGC G	CCCCGACCGGTAAGGA AGTCCAGGCCAG	PCR
ΔSS-Sho^{ΔRGG}-YFP	ΔSS-Sho-YFP	GGGGGGGCTAGCAACCA TGAAGGGCGGCGCACGA G	CCCCGACCGGTAAGGA AGTCCAGGCCAG	PCR
ΔSS-Sho^{Δ(RXXX)8}-YFP	ΔSS-Sho-YFP	GACAGCTGTTCCGCCGT GGCCGCTGCAGGG	CCCTGCAGCGGCCACGG CGGAACAGCTGTC	mutagenesis
GFP-sNLS	pEGFP-C1	AATTCACGCGGAGGAGC TCGAGGTAGTGACGGG GG TAAG	GATCCTTACCCCCGTGC ACTACCTCGAGCTCCTC CGCGTG	linker inszert
GFP-RGG	pEGFP-C1	AATTCACGTGGAGGTGC TCGAGGCAGTGCCGGG GGGTGCGAGGGGTTAAG	GATCCTTAACCTCCTCG CACCCCCCGGCACTGC CTCGAGCACCTCCACGT G	linker inszert
GFP-(RXXX)₈	pEGFP-C1	CGCGTAAGGCCGGCGCC CCGCTACGGCTCCTCTCT GCGCTAGG	GATCCCTAGCGCAGAGA GGAGCCGTAGCGGGGCG CCGGCCTTA	linker inszert
YFP-Sho^{52-56A}	YFP-Sho	GGGGCATCAAGAGTACG AGTAAGGGCTGCTGCTG CTGCTGGCTCCTCTCTGC GC	GCGCAGAGAGGAGCCA GCAGCAGCAGCAGCCCT TACTCGTACTCTTGATGC CCC	mutagenesis
ΔSS-YFP-Sho^{52-56A}	ΔSS-YFP-Sho	GGGGCATCAAGAGTACG AGTAAGGGCTGCTGCTG CTGCTGGCTCCTCTCTGC GC	GCGCAGAGAGGAGCCA GCAGCAGCAGCAGCCCT TACTCGTACTCTTGATGC CCC	mutagenesis
GFP-(RXXX)₈^{52-56A}	GFP-(RXXX) ₈	GGGGCATCAAGAGTACG AGTAAGGGCTGCTGCTG CTGCTGGCTCCTCTCTGC GC	GCGCAGAGAGGAGCCA GCAGCAGCAGCAGCCCT TACTCGTACTCTTGATGC CCC	mutagenesis

GFP-(QXXX)₈	GFP-(RXXX)₈	AATTCTCAAGGAGGCGC TCAAGGCAGTGCCCAGG GGGTACAAGGAGGTGCA	CCCTTGTCACCTCCTTG TACCCCTGGGCACTG CCTTGAGCGCCTCCTTG AG	linker inszert
		CAAGGGGCATCACAGGT ACGCGTACAACCAGCAC CACAATACGGCTCCTAG G	GATCCCTAGGAGCCGTA TTGTGGTGCTGGTTGTAC GCGTACCTGTGATGC	linker inszert
(RXXX)₈-GFP-β-Gal	GFP-β-Gal	AAAAAAGTCGACCATGA AGGGCGGCCGCGGAG	AAAAAAGCTAGCGCGCA GAGAGGAGCCGT	PCR
Sho-GFP-β-Gal	GFP-β-Gal	AAAAAAGTCGACCATGA AGGGCGGCCGCGGAG	AAAAAAGCTAGCACCGG AAGTCCAGGCC	PCR
PrP-GFP-β-Gal	NLS-GFP-β-Gal	AAAAAAGTCGACCATG AAAAAGCGGCCAAAGC	CCCCCGCTAGCTGATC TTCTCCCGTCGTA	PCR
PrP^N-GFP-β-Gal	NLS-GFP-β-Gal	AAAAAAGTCGACCATGA AAAAGCGGCCAAAGC	CCCCCGCTAGCAGCCC CCGCCACATG	PCR
(RXXX)₈-GFP	(RXXX)₈-GFP-β-Gal	(RXXX)₈-GFP-β-Gal és pEGFP-C1 vektorok BsrGI és MfeI emésztése		
PrP-GFP	PrP-GFP-β-Gal	PrP-GFP-β-Gal és pEGFP-C1 vektorok BsrGI és MfeI emésztése		
PrP^N-GFP	PrP^N-GFP-β-Gal	PrP^N-GFP-β-Gal és pEGFP-C1 vektorok BsrGI és MfeI emésztése		
NLS^{x3SV40}-GFP	NLS^{x3SV40}-GFP-β-Gal	NLS^{x3SV40}-GFP-β-Gal és pEGFP-C1 vektorok BsrGI és MfeI emésztése		
GFP-(Cherry)₄	GFP-(Cherry)₂	GGGGGAAGCTTCGATC TGTGAGCAAAGG	TTTTTCAATTGCTAATG AGCTCTAAGTTTCTTGTA CAGTTC	PCR
GFP-(Cherry)₄-(RXXX)₈	GFP-(RXXX)₈	GFP-(RXXX)₈ és GFP-(Cherry)₄ vektorok BglII és SacI emésztése		
GFP-(Cherry)₄-PrP	GFP-(Cherry)₄-(RXXX)₈	AAAAAAGAGCTCCCAAA AAGCGGCCAAAGC	CCCCCGGATTCTTATG ATCTTCTCCCGTCGTA	PCR
GFP-(Cherry)₄-PrP^N	GFP-(Cherry)₄-(RXXX)₈	AAAAAAGAGCTCCCAAA AAGCGGCCAAAGC	AAAAAAGGATCCTTAAG CCCCGCCACATG	PCR
GFP-(Cherry)₄-NLS^{x1SV40}	GFP-(Cherry)₄-(RXXX)₈	CAACCAAAAAAGAAAC GAAAAGTATAGG	GATCCCTATACTTTTCGT TTCTTTTTTGTTGAGCT	linker inszert

GFP-(Cherry)₄-NLS^{qki5}	GFP-NLS ^{qki5}	GFP-NLS ^{qki5} és GFP-(Cherry) ₄ vektorok BglII és SacI emésztése		
GFP-PrP	GFP-(Cherry) ₄ -PrP	GATCTGGAGTGC GGCCG CTTGCGAATTCTGGAGC T	CCAGAATTCGCAAGCGG CCGCACTCCA	linker inszert
GFP-PrP^N	GFP-(Cherry) ₄ -PrP ^N	GATCTGGAGTGC GGCCG CTTGCGAATTCTGGAGC T	CCAGAATTCGCAAGCGG CCGCACTCCA	linker inszert
Sho-NLS-YFP	Sho-YFP	GGGGGGCCGGAGAGAC GCGCAGATCCAAAAAAG AAG	GGGGGGG CCGGGGAGACGTTATCT ACCTTCTCTCTT	PCR inszert
Sho-YFP-NLS	Sho-GFP	Sho-GFP és YFP-NLS-GPI vektorok AgeI és EcoRI emésztése		
YFP-Sho-KDEL	YFP-NLS-GPI	AATTAATTAAAGATGA GCTATAG	GATCCTATAGCTCATCTT TAATAT	linker inszert
Cherry	Cherry-6HCS	AGCTTGAGACGCGAAT TCACGCGTGGTACCAGA TCTA	AGCTTAGATCTGGTACC ACGCGTGAATTCGCGTC TCCA	linker inszert
Cherry-Sho	Cherry	AATAGAATTCAAGGGCG GCCGCGGAGG	ATTCCAAGCTTCAGCCG GAAGTCCAGGCC	PCR
Cherry-ΔsNLS	Cherry-Sho	GTGACGATGATGACAAA GGGGTGCGCGG	CCGCGCACCCCTTTGTC ATCATCGTCAC	mutagenézis
Cherry-ΔRGG	Cherry-Sho	CAAAAAGGGCGGCGCA CGCGGGG	CCCCGCGTGCGCCGCC TTTTTG	mutagenézis
Cherry-Δ(RXXX)₈	Cherry-Sho	GACGATGATGACAAAGT GGCGGCTGC	GCAGCCGCCACTTTGTC ATCATCGTC	mutagenézis
Cherry-sNLS	Cherry	AATTCACGCGGAGGAGC TCGAGGTAGTGCACGGG GG TAAG	GATCCTTACCCCGTGC ACTACCTCGAGCTCCTC CGCGTG	linker inszert
		TGACGATGATGACAAAC GCGGAGGAGCTCGAG	CTCGAGCTCCTCCGCT TTGTCATCATCGTCA	mutagenézis
Cherry-RGG	Cherry	AATTCACGTGGAGGTGC TCGAGGCA GTGCCGGG GGGTGCGAGGGGTTAAG	GATCCTTAACCTCCTCG CACCCCCGGGCACTGC CTCGAGCACCTCCACGT G	linker inszert
		TGACGATGATGACAAAC GTGGAGGTGCTCGAGG	CCTCGAGCACCTCCACG TTGTCATCATCGTCA	mutagenézis

Cherry-(RXXX) ₈	Cherry	TATCTGAATTCAAGGGC GGCCGCGGAGG	AAGCCTAGATCTGCGCA GAGAGGAGCCGTAG	PCR
		TGACGATGATGACAAAA AGGGCGGCCGCGG	CCGCGGCCGCCCTTTT GTCATCATCGTCA	mutagenézis

F1. táblázat A munka során készített plazmid konstrukciók listája, a felhasznált kiindulási plazmid, a felhasznált primerek vagy linker oligonukleotidok és a klónozási módszertan megnevezése. Sárga háttérrel jelöltem az általam készített és kivitelezett konstrukciókat, barnával Kulcsár Péter konstrukcióit, lilával Vodicska Barbara konstrukcióit, késsel Vida István konstrukcióit és bordóval Dr. Borsy Adrienn konstrukcióit.



F1. ábra A kísérletekhez felhasznált vegyületek (Brefeldin-A, 2-deoxy-D-glükóz, Eeyarestatin I) szerkezeti képlete

SAJÁT KÖZLEMÉNYEK LISTÁJA

A dolgozat alapjául szolgáló tudományos publikációk:

E. Tóth, E. Welker,

Comparison of anti-Shadoo antibodies – Where is the endogenous Shadoo protein?

WASET (2012) 71: 259-261

E. Tóth, P. I. Kulcsár, E. Fodor, F. Ayaydin, L. Kalmár, A. É. Borsy, L. László, E. Welker,

The highly conserved, N-terminal (RXXX)₈ motif of mouse Shadoo mediates nuclear accumulation

BBA Mol Cell Res (2013) 1833: 1199-1211

E. Tóth, K. Huszár, P. Bencsura, P. I. Kulcsár, B. Vodicska, A. Nyeste, Zs. Welker, Sz. Tóth, E. Welker,

Restriction enzyme body doubles and PCR cloning: On the general use of Type IIS restriction enzymes for cloning

PlosONE (2014) 9(3): e90896

Megjelent konferencia absztraktok:

E. Tóth, P. I. Kulcsár, E. Fodor, F. Ayaydin, L. László, E. Welker,

Prion Proteins in health and disease: the (RXXX)₈ motif of Shadoo is a NLS

Prion 5(2011):90

Prion 2011: New World Congress (2011, Montréal, Kanada)

A. Nyeste, F. Ayaydin, E. Fodor, **E. Tóth**, G. E. Tusnády, I. Simon, E. Welker,

Alternative translation initiation may alter the cellular distribution of GFP-tagged proteins

Prion 5(2011):70

Prion 2011: New World Congress (2011, Montréal, Kanada)

Tóth E., Kulcsár P. I., Fodor E., Ayaydin F., László L., Welker E.,

A Shadoo fehérje sejtszintű lokalizációja

XVI. Sejt- és Fejlődésbiológiai Napok (2011, Siófok, Magyarország)

E. Tóth, P. I. Kulcsár, L. László, E. Welker,

Nuclear localization and transport of Shadoo and Prion Proteins

Prion 6(2012):119

Prion 2012 Conference (2012, Amszterdam, Hollandia)

I. Vida, A. Borsy, **E. Tóth**, E. Welker,

Examination of nucleic acid binding of the newest prion protein, Shadoo, using
Agarose Gel Shift Assay

Hungarian Molecular Life Sciences 2013 (2013, Siófok, Magyarország)

B. Vodicska, A. Nyeste, **E. Tóth**, E. Welker,

A membrane protein in the nucleus

Hungarian Molecular Life Sciences 2013 (2013, Siófok, Magyarország)

E. Tóth, P. I. Kulcsár, E. Fodor, F. Ayaydin, L. Kalmár, A. É. Borsy, L. László, E. Welker,

Dual localization of the prion protein family members: the highly conserved, N-terminal (RXXX)₈ motif of mouse Shadoo mediates nuclear accumulation

Hungarian Molecular Life Sciences 2013 (2013, Siófok, Magyarország)

E. Tóth, P. I. Kulcsár, E. Fodor, F. Ayaydin, L. Kalmár, A. É. Borsy, L. László, E. Welker,

Dual localization of the prion protein family members: the highly conserved, N-terminal (RXXX)₈ motif of mouse Shadoo mediates nuclear accumulation

Prion 7(2013):92

Prion 2013: Conquering frontiers (2014, Banff, Kanada)

Tóth E., Huszár K., Bencsura P., Kulcsár P. I., Vodicska B., Nyeste A., Welker Zs., Tóth Sz.,
Welker E.,

Restrikciós enzim dublőrök: a Type IIS restrikciós endonukleázok általános alkalmazása 2

44. Membrán-Transzport Konferencia (2014, Sümeg, Magyarország)

E. Tóth, K. Huszár, P. Bencsura, P. I. Kulcsár, B. Vodicska, A. Nyeste, Zs. Welker, Sz. Tóth, E. Welker,

Cloning the Shadoo and Prion proteins: Restriction Enzyme Body Doubles and PCR cloning

Prion 8(2014): 43

Prion 2014: Shaping the future of prion research (2014, Trieszt, Olaszország)